

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM
Laboratório de Fisiologia Vegetal

Estudos sobre genes da família Yellow Stripe Like e busca de novos genes importantes para a alocação de ferro para o grão de arroz

Aluno: Guilherme Leitão Duarte
Orientadora: Dra. Janette Palma Fett

Banca Examinadora:

Dr. Marcelo Ehlers Loureiro, Universidade Federal de Viçosa.
Dra. Maria Helena Zanettini, Departamento de Genética, UFRGS.
Dra. Márcia Pinheiro Margis, PPGBCM, UFRGS.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM, da UFRGS, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Março de 2009

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha sincera gratidão às pessoas que em algum momento tiveram participação em minha formação, contribuindo direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho.

Em primeiro lugar à minha família (Mãe, Pai, Ricardo e Marcela), pelo carinho, apoio, estímulo e compreensão durante toda vida.

À minha orientadora, professora Janette, e ao professor Arthur, pela dedicação, paciência e amizade, se tornando exemplos de profissionais.

Aos colegas de laboratório, principalmente ao grande grupo dos arroseiros: grupo guitarra (eu, Tati e Raul), grupo bangu (Ricardo e Vinícius), Felipe, Marta, Kaka, Edilena, Paloma, Lívia, e aos colegas das linhas de pesquisa psychotria, pinus, quillaja, eucalipto, valeriana, mimosa, etc: Daniel, Juli, Vari, Denise, Joséli, Kelly, Naíla, Carol, Hélio, Fernanda, Ana, Carina, Márcia, Diogo, Denilson e Rochinha, que se tornaram grandes amigos com os quais pude compartilhar e aprender muita coisa.

Aos demais colegas do centro de Biotecnologia da UFRGS, principalmente o pessoal do Laboratório de Genomas e Populações de Plantas e Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio, pelas amizades, ajuda e empréstimo de material sempre que foi necessário.

Ao IRGA (Instituto Rio Grandense do Arroz) por ceder espaço e apoiar nossas pesquisas.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia da UFRGS pela amizade e eficiência.

À UFRGS, pelo ensino gratuito e de qualidade.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao HarvestPlus, pelo auxílio financeiro.

Lista de abreviaturas e siglas

3'-UTR – 3' não traduzida

μl – microlitros

°C – graus Celsius

AHA – Arabidopsis H-ATPase

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

cDNA – Ácido Desoxirribonucléico complementar

DMA – Ácido Deoximuginéico

MA – Ácido Muginéico

RNA – Ácido Ribonucléico

CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical

DW – Dry Weight (peso seco)

Fe⁺² – Ferro na forma de íon férrico

Fe⁺³ – Ferro na forma de íon ferroso

FRO – Ferric-Chelate Reductase

GUS – β-glucuronidase

ICP-OES - Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado

IRGA – Instituto Riograndense do Arroz

IRT – Iron Regulated Transporter

NA – Nicotianamina

NRAMP – Natural Resistance Associated to Macrophage Protein

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

Ct – Threshold cycle

SSH – Suppression Subtraction Hybridization

RDA – Representational Difference Analysis

ZRT – Zinc-Regulated Transporter

ZIP – ZRT-IRT Protein

YSL – Yellow Stripe Like

Resumo

O arroz é umas das mais importantes plantas cultivadas no mundo, sendo constituinte da dieta básica de mais da metade da população humana, inclusive no Brasil. Entretanto, o arroz é um cereal nutricionalmente pobre, apresentando baixas concentrações de metais essenciais, como o ferro e o zinco. Programas de melhoramento e de engenharia genética têm sido empregados na tentativa de melhorar o teor nutritivo dos grãos de arroz. Entretanto, para se alcançar este objetivo é essencial conhecer os mecanismos que envolvem a aquisição de metais, transporte interno e armazenamento nas plantas. A literatura recente tem revelado a existência de diversas famílias de genes candidatos a desempenharem função na homeostase de metais em arroz (genes *Yellow Stripe Like*, *IRT*, *FRO*, *MTP*, etc). Entre estes, a família *Yellow Stripe Like* é forte candidata a possuir genes envolvidos na alocação de ferro para o grão, visto que é uma família numerosa (18 genes) de transportadores de ferro, com diferentes isoformas capazes de transportar ferro ligado a fitossideróforos ou a nicotiamina (o principal quelante de ferro intracelular), e com expressão comprovada de pelo menos uma isoforma em células de floema. No entanto, a alocação de minerais para o grão é um processo altamente regulado, que provavelmente requer a atividade de outros genes, com funções ainda desconhecidas. Neste estudo visamos avaliar a contribuição de genes *YSL* em plantas de arroz e identificar novos genes potencialmente envolvidos com o transporte de metais aos grãos de arroz utilizando diferentes ferramentas: análise de plantas mutantes no gene *OsYSL15* por inserção do retroelemento *TOS17*; avaliação da expressão de genes *YSL* em folhas bandeira e panículas de arroz em dois estádios de desenvolvimento; construção de uma biblioteca de hibridização subtrativa (*SSH*) de panículas em dois estádios de desenvolvimento, visando identificar genes com expressão induzida no enchimento dos grãos. Estas diferentes abordagens nos permitiram concluir que: o gene *OsYSL15* é fortemente induzido em raízes sob deficiência de ferro, mas não

necessário para o desenvolvimento das plantas nas condições estudadas; a função do gene *OsYSL15* provavelmente possui sobreposição com as de outros transportadores de ferro, que podem compensar a sua falta; o gene *OsYSL18* é um forte candidato a participar dos processos de alocação de minerais para os grãos de arroz. Além disso, foi possível identificar um novo gene, com função ainda desconhecida, com alta expressão em panículas de arroz durante o enchimento do grão.

Abstract

Rice is one of the most important crops worldwide. Although being a poor source of nutrients, such as iron and zinc, rice is the dietary basis of over half the world's population, including Brazil. Breeding and genetic engineering programs have been employed with the intent to improve the nutritive characteristics in rice grains, including the increase of mineral nutrients, such as iron and zinc. To reach this objective, it is necessary to understand how metal homeostasis occurs in plants, including rhizosphere uptake, internal transport and storage. The recent literature has revealed several families of genes which are candidates to be involved in metal homeostasis in rice (*Yellow Stripe Like*, *IRT*, *FRO*, *MTP*, etc). Among them, the *Yellow Stripe Like* family is a strong candidate to contain genes involved with iron allocation to the grain. This is a large family (18 genes) of iron transporters, with different isoforms being able to transport iron chelated to siderophores or to nicotianamine (the main intracellular iron ligand in plants), and with at least one isoform being expressed in phloem cells. However, mineral allocation to the grain is a highly regulated process, which probably requires the activity of other genes, with functions that are still unknown. This study aimed at the evaluation of the contribution of *YSL* genes and at the identification of new genes potentially involved with metal transport to the rice grain, making use of three different tools: analysis of *OsYSL15* mutant plants, containing *TOS17* retroelement insertion; gene expression evaluation of *YSL* genes in rice flag leaves and panicles during two reproductive stages; construction of a panicle subtractive library (*SSH*) comparing two reproductive stages, in order to identify genes up-regulated during grain filling. These diverse approaches allowed us to reach the following conclusions: the *OsYSL15* gene is strongly induced in roots under iron deficiency, but is not necessary for plant development under control conditions; probably there is function overlap between the *OsYSL15* gene and other iron transporters, which can compensate for its absence; the *OsYSL18* gene is a strong candidate to participate in mineral allocation to

the rice grain. Moreover, it was possible to identify a new gene, with still unknown function, which is highly up-regulated in panicles after anthesis.

Índice

Introdução	9
Objetivos	18
An insertional mutation in <i>OsYSL15</i> leads to up-regulation of diverse iron uptake genes in rice	19
Abstract.....	20
Introduction	21
Materials and methods.....	23
Results and discussion.....	26
References.....	31
Análise da expressão de genes <i>Yellow Stripe Like</i> em folhas bandeira e panículas de arroz em dois estádios de desenvolvimento dos grãos	42
Introdução	43
Materiais e métodos.....	44
Resultados e discussão	47
Identificação de novos genes envolvidos no transporte de ferro ao grão utilizando a técnica de SSH (<i>Suppression Subtraction Hybridization</i>)	59
Introdução	60
Materiais e métodos.....	62
Resultados e discussão	67
Considerações finais	77
Referências bibliográficas	79

Introdução

O arroz é um dos principais produtos agrícolas em nível mundial, sendo constituinte da dieta humana básica em muitas culturas, inclusive no Brasil. Entretanto, o grão de arroz é uma fonte de nutrientes pobre. Em humanos, a deficiência de ferro é a desnutrição mineral de maior incidência (Meng et al, 2005). Os estudos envolvendo homeostase de ferro em plantas ainda são poucos e o entendimento de como as plantas lidam com este mineral seria de grande importância para a biofortificação ou desenvolvimento de cultivares mais nutritivas, de espécies agronomicamente importantes, o que ajudaria a contornar o problema de desnutrição em humanos.

O ferro é um micronutriente essencial para o desenvolvimento de virtualmente todos os seres vivos. As plantas desempenham um papel fundamental na entrada deste metal na cadeia alimentar. O ferro, por ser um metal de transição, tem a capacidade de ganhar ou perder um elétron, o que confere a este elemento características redox necessárias para participar direta e indiretamente de diversos processos metabólicos, sendo necessário em reações de transferência de elétrons da respiração e da fotossíntese, na redução do nitrogênio e do enxofre, na síntese de clorofila, entre outros importantes processos biológicos (Marschner, 1995; Briat et al., 2007). Entretanto, esta capacidade redox também permite a este metal formar radicais danosos, como a hidroxila, através da reação de Fenton (Becana *et al*, 1998). Este radical é altamente tóxico, sendo conhecido como o mais potente agente oxidante (Halliwell e Gutteridge, 1992). Isso pode se tornar um problema para os vegetais cultivados em solos ácidos e/ou em condições anaeróbicas, como nas lavouras alagadas de arroz. Nestas condições o ferro se apresenta na forma reduzida (Fe^{+2}), que é muito mais solúvel, podendo ser facilmente transportado da rizosfera para dentro das plantas, o que pode causar toxidez por excesso de ferro. O estresse oxidativo gerado por excesso de ferro pode levar à perda de integridade celular e à

morte (Briat e Lobréaux, 1998; Guerinot e Yi, 1994; Beinfait, 1989). Por outro lado, em condições aeróbicas e solos calcários, que cobrem cerca de um terço da superfície terrestre, o ferro é muito pouco solúvel, se apresentando em sua maior parte complexado à matéria orgânica, formando precipitados de hidróxido de Fe^{+3} (Guerinot e Yi, 1994). Plantas de arroz são especialmente suscetíveis a baixo suprimento de ferro, ao contrário de outras gramíneas cultivadas como a cevada (Takahashi et al., 2001; Mori et al., 1991). Quando severa, a deficiência de ferro leva à redução da produtividade e até mesmo perdas na safra.

Portanto, a homeostase do ferro é um processo de extrema importância para o vegetal, envolvendo diversos mecanismos como a absorção, transporte, localização subcelular e armazenamento em órgãos e organelas especializadas, tanto em condições de excesso como em deficiência de ferro.

Em condições de suficiência de ferro e solos oxigenados todas as plantas reduzem Fe^{3+} -quelatos e transportam o Fe^{2+} resultante através da membrana plasmática via um transportador de baixa afinidade (Curie e Briat, 2003). Em condições de deficiência de ferro as plantas desenvolveram diferentes mecanismos para aumentar a absorção deste mineral e suprir a sua necessidade. Na Estratégia I, empregada por todas as plantas superiores, exceto gramíneas, ATPases de membrana são responsáveis por acidificar a rizosfera, aumentando a disponibilidade do ferro, que então é necessariamente reduzido de Fe^{+3} a Fe^{+2} por uma redutase de quelatos de ferro presente na membrana plasmática das raízes (família FRO) para ser então transportado por transportadores de Fe^{+2} livre (família IRT) para dentro da célula. Já na Estratégia II, típica de gramíneas, as plantas produzem e excretam pelas raízes fitossideróforos, aminoácidos modificados que possuem alta afinidade por Fe^{+3} , e transportam o complexo Fe^{+3} -fitossideróforo para dentro da célula através dos transportadores da família Yellow Stripe. Um trabalho do nosso grupo (Gross et al, 2003) mostrou que o arroz, uma gramínea, possui vários genes típicos da estratégia I,

assim como *Arabidopsis thaliana*, a planta modelo das dicotiledôneas, apresenta genes típicos da estratégia II. Portanto muita pesquisa ainda deverá ser realizada antes que sejam totalmente compreendidas as estratégias das plantas para a absorção de ferro. Além disto, diferentes transportadores certamente são necessários para o transporte de ferro entre diferentes compartimentos celulares e possivelmente diferentes órgãos ou estádios de desenvolvimento. A multiplicidade de transportadores dentro de algumas famílias gênicas (por exemplo, 18 genes Yellow Stripe em arroz) provavelmente está relacionada à necessidade de controle preciso dos níveis de ferro na planta (assim como na célula e em cada compartimento subcelular), tendo em vista que o ferro é um elemento cujos níveis tanto muito baixos quanto muito altos são prejudiciais.

A absorção e a homeostase do ferro nas plantas dependem da atividade de vários produtos gênicos, alguns dos quais possivelmente exercem papel importante na resistência ao excesso de ferro. Estudos em nível molecular da homeostase do ferro em plantas estão apenas começando, sendo o primeiro gene que codifica uma proteína transportadora de ferro em plantas, *IRT1* (*Iron Regulated Transporter 1*), identificado em *A. thaliana* em 1996 (Eide et al, 1996). Este gene é capaz de complementar leveduras deficientes na aquisição de ferro, sendo mais eficiente no transporte de Fe^{+2} que Fe^{+3} . *AtIRT1* tem sua expressão induzida em raízes de plantas submetidas à deficiência de ferro (Fox e Guerinot, 1998). A identificação deste gene permitiu a descoberta da família gênica *ZIP* (genes *ZRT-IRT*). *ZRT1* e *ZRT2*, identificados em *Saccharomyces cerevisiae*, são transportadores de zinco (Zhao e Eide, 1996A, 1996B). Genes desta família foram identificados em diversas espécies, inclusive em arroz (Fox e Guerinot, 1998; Gross et al, 2003).

Mais recentemente foram identificados outros genes de *Arabidopsis* envolvidos na absorção do ferro: *AHA2* (*Arabidopsis H-ATPase*), *FRO2* (*Ferric-Chelate Reductase*) e *NRAMP1* (*Natural Resistance Associate to Macrophage Protein*) (Fox e Guerinot,

1998; Robinson et al, 1999; Thomine et al, 2000, Curie et al, 2000) e um gene de milho, *YS1* (*Yellow Stripe 1*), responsável pelo transporte do complexo ferro-sideróforo, característico de gramíneas (Curie et al, 2001).

O Gene *AtAHA2* é induzido em condições de deficiência de ferro. Sua capacidade de bombear prótons para rizosfera é de extrema importância para acidificação do meio e aumentar a solubilidade do Fe^{+3} (Fox e Guerinot, 1998). O gene *FRO2*, identificado e caracterizado em *A. thaliana*, tem por função reduzir Fe^{+3} encontrado na rizosfera (Robinson et al, 1999). O ferro reduzido pode ser transportado para dentro das raízes pela proteína *IRT1* (Eide et al, 1996). O gene *AtNRAMP3* está relacionado com o metabolismo interno das plantas em relação ao ferro. Este gene é expresso em tonoplastos e tem por função o transporte de ferro do citoplasma para dentro dos vacúolos (Thomine et al, 2000). Em gramíneas, a estratégia principal empregada no transporte de ferro se baseia na capacidade de secreção de sideróforos que se ligam à forma oxidada do ferro (Fe^{+3}) e são transportados por transportadores da família *Yellow Stripe*. O gene *YS1* de milho tem sua expressão induzida em raízes e partes aéreas de plantas submetidas à deficiência de ferro. Foi demonstrada a sua capacidade de transportar principalmente o complexo Fe^{+3} -sideróforo. Os sideróforos secretados pelas plantas são pequenas moléculas derivadas de ácido mugineico (MAs – *mugineic acid*). Na rota biosintética dos MAs, uma metionina é convertida a ácido deoxymugineico (DMA). Em arroz, o DMA é secretado como fitossideróforo, enquanto em outras espécies, como cevada e milho, utilizam o DMA para sintetizar outros MAs (Inoue et al, 2009).

Em arroz, nosso grupo identificou 18 genes *YSL* (*Yellow Stripe Like*) por análises de similaridade de sequências com o gene *YS1* de milho (Gross et al, 2003). Entretanto, um trabalho publicado posteriormente por Koike et al (2004) também identificou os mesmo genes, que foram nomeados ao acaso como *OsYSL1* a *OsYSL18*. Os nomes empregados a cada gene identificado em ambos trabalhos não são correspondentes

(Figura 1). Para fins científicos, este trabalho utiliza a nomenclatura proposta por Koike et al (2004).

Genes *YSL* têm sido identificados e caracterizados em diversas espécies, como cevada (Murata et al, 2006), tabaco (Hodoshima et al, 2007), *Thlaspi caerulescens* (Gendre et al, 2007) e também em dicotiledôneas, como *A. thaliana* (DiDonato et al, 2004; Schaaf et al, 2004; Le Jean et al, 2005; Waters et al, 2006). Entretanto, em arroz apenas dois dos 18 genes *YSL* foram caracterizados até o momento.

Koike et al (2004) demonstraram por *Northern blot* que o gene *OsYSL2* é induzido em condições de deficiência de ferro em folhas de arroz. Para investigar mais detalhadamente as características funcionais deste gene, os autores fusionaram o promotor do gene *OsYSL2* com o gene repórter *GUS* (β -glucuronidase). Os resultados comprovam que *OsYSL2* é expresso em células do floema de raízes, sendo induzido em condições de deficiência de ferro. Também foi observada atividade de *GUS* em células do floema de folhas e, em condições de deficiência de ferro, *OsYSL2* é expresso em todos os tecidos foliares. Atividade de *GUS* também foi detectada em tecidos reprodutivos e em sementes em desenvolvimento. Os resultados obtidos por Koike et al (2004) sugerem que *OsYSL2* é um gene regulado por ferro e é capaz de transportar metais ligados a nicotianamina em floema de raízes de folhas.

O segundo gene *YSL* caracterizado em arroz é *OsYSL15*. Já se conhecia a regulação deste gene por ferro, sendo induzido em raízes submetidas à deficiência deste metal (Koike et al, 2004). Inoue et al (2009), através de diversas técnicas, como fusão de promotor com o gene repórter *GUS*, microdissecção a *laser*, silenciamento gênico e complementação de levedura, demonstraram que *OsYSL15* tem sua expressão induzida em raízes submetidas à deficiência de ferro, sendo este gene responsável pelo transporte de Fe^{+3} -DMA da rizosfera para dentro da planta. Alguns resultados sugerem que este gene possa estar envolvido no transporte de longa distância de

ferro complexado a DMA. Os autores ainda sugerem o envolvimento do *OsYSL15* na germinação e no enchimento de grãos de arroz.

O entendimento dos mecanismos de regulação da homeostase do ferro em plantas é de fundamental importância tanto do ponto de vista agrônomo (possibilitando maiores produtividades em plantas que não sofram os efeitos danosos da deficiência ou do excesso de ferro) quanto do ponto de vista da nutrição humana (possibilitando a produção de alimentos de origem vegetal com altos níveis de ferro disponíveis para absorção pelo sistema digestivo humano) (Gura, 1999; Grotz e Guerinot, 2002). A compreensão de tais mecanismos em arroz seria extremamente importante também do ponto de vista científico, uma vez que o arroz desponta como planta modelo (fisiológico e genético) para as monocotiledôneas, ao lado da dicotiledônea *A. thaliana*. O arroz foi a segunda Angiosperma (e primeira monocotiledônea) a ter o seu genoma completamente sequenciado (Burr et al, 2005) e a descoberta da existência de alto grau de sintenia entre o seu genoma (o menor das gramíneas) e os de outros cereais consiste em uma ferramenta importante no melhoramento de várias outras espécies (Gale e Devos, 1998).

Além da sequência genômica completa, várias novas ferramentas para a pesquisa em arroz têm sido desenvolvidas, como a geração de grandes coleções de mutantes (Hirochika et al, 2004). O uso de mutantes na elucidação da função de novos genes (cujas seqüências são geradas em projetos de sequenciamento) é conhecido como uma técnica de “genética reversa”, onde, a partir do conhecimento de qual gene está mutado, pode-se chegar ao fenótipo pelo qual ele é responsável. Esta abordagem já permitiu a identificação da função de vários genes de *Arabidopsis* (Ostergaard e Yanofsky, 2004) e oferece grandes possibilidades em arroz. O *Rice Genome Resource Center*, no Japão, possui uma coleção de mutantes de arroz, gerados por inserção ao acaso do retroelemento *TOS17* em diferentes posições no genoma. As linhagens de plantas mutantes possuem o retroelemento estável no genoma. A

disponibilização das seqüências flanqueadoras de onde o elemento transponível *TOS17* se inseriu permitem a identificação (*in silico*) de mutantes em genes de interesse e a solicitação de sementes dos mesmos.

Considerando-se o papel potencial de genes da família Yellow Stripe no transporte de ferro em plantas de arroz (já tendo sido identificado um gene essencialmente responsável pelo transporte de Fe^{+3} - DMA em raízes e outro sendo capaz de transportar Fe^{+2} - Nicotianamina em células de floema), é importante investigar a contribuição destes e dos demais genes desta família para a alocação de ferro para o grão de arroz. Durante o enchimento do grão de arroz, a folha bandeira é responsável pelo fornecimento de grande parte dos nutrientes para a panícula mais próxima (Grusak e DellaPenna, 1999 apud Narayanan et al, 2007). É possível que a entrada do ferro e de outros minerais nas células do floema, em folhas bandeira, seja uma etapa determinante para a alocação destes para o grão. Desta forma, é importante investigar a expressão de genes Yellow Stripe em folhas bandeira durante o desenvolvimento reprodutivo de plantas de arroz. O transporte de minerais dentro da panícula também pode ser determinante da distribuição final de minerais entre o grão e os demais órgãos que a compõe. Além disso, maior expressão de transportadores do tipo Yellow Stripe nas raízes durante o processo de enchimento do grão poderia, potencialmente, contribuir para a maior concentração final de ferro em grãos de arroz. Assim, estudos detalhados sobre o papel do gene *OsYSL15* também são necessários.

No entanto, a homeostase de metais é um processo altamente regulado, podendo envolver genes com função ainda desconhecida, como outros transportadores, fatores de transcrição, etc. Como ferramentas para a identificação de novos genes expressos ou induzidos em determinada situação, foram desenvolvidas técnicas como o *Suppression PCR*, *RDA* (Representational Difference Analysis) e o *SSH* (*Suppression Subtraction Hybridization*). A técnica de *RDA* foi inicialmente desenvolvida para identificar diferenças entre populações de DNA genômico (Lisitsyn et al, 1993).

Hubank & Schatz (1994) modificaram a técnica com o intuito de analisar diferenças entre populações de mRNAs. Baseada em ciclos sucessivos de hibridização subtrativa seguida de PCR, esta técnica enriquece a amostra e permite o isolamento de seqüências relativas a RNAs mensageiros expressos diferencialmente. Também reduz a representação de seqüências não-diferencialmente expressas. É um método bastante sensível e permite o isolamento de genes cuja expressão é aumentada ou diminuída entre duas populações diferentes de cDNA relativas a duas situações contrastantes (Pastorian et al, 2000). Um de seus poucos pontos negativos é a não-normalização das seqüências encontradas, muitas vezes resultando em redundâncias bastante altas para uma mesma seqüência. Já a técnica de *SSH* é um aperfeiçoamento das técnicas anteriores, e permite a comparação entre duas populações de cDNA, incluindo uma etapa de normalização (Diatchenko et al, 1996). Da mesma maneira que o *RDA*, esta técnica permite identificar genes que são induzidos em uma situação em comparação a uma outra. É uma técnica bem eficiente e tem sido bastante utilizada com intuito de identificar novos genes (Hou et al, 2005; Legrand et al, 2007; Merchan et al, 2007; Ouyang et al, 2007; Rizzo et al., 2007; Zinser et al, 2007).

Espera-se que este trabalho possa fornecer resultados que contribuam para a futura obtenção de plantas de arroz com alto teor de ferro no grão, que seriam de grande importância em relação à nutrição humana. Especificamente no caso da cultura do arroz no Rio Grande do Sul, parte dos resultados deste trabalho poderá ser usada para o melhoramento genético da cultura, em colaboração com pesquisadores e técnicos do IRGA (Instituto Riograndense do Arroz).

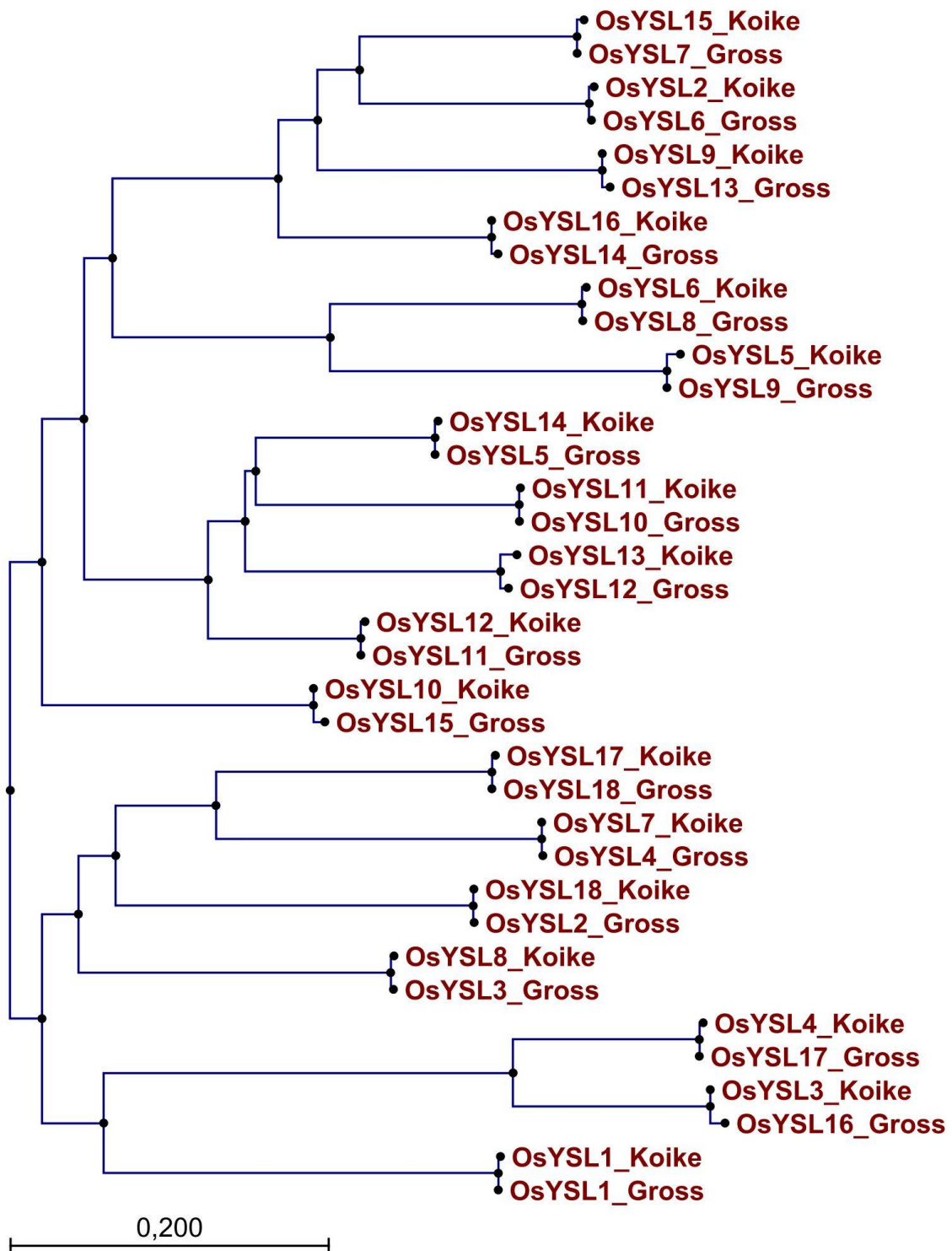


Figura 1. Árvore filogenética dos genes *YSL* com nomenclatura de Gross et al (2003) e Koike et al (2004). Método *Neighbor-joining*.

Objetivos

O primeiro objetivo deste trabalho é investigar as possíveis relações de genes *YSL* com a homeostase de ferro em plantas de arroz, com ênfase na alocação de ferro para o grão. Para isto foram empregadas as seguintes abordagens:

- Caracterização de plantas mutantes no gene *OsYSL15* por inserção do retrotransposon *TOS17*;

- Avaliação da expressão de genes *YSL* em folhas bandeira e panículas de plantas de arroz com diferentes concentrações de ferro nos grãos.

O segundo objetivo é a identificação de novos genes envolvidos com a nutrição de grãos de arroz durante a fase de enchimento dos grãos. Para isto foi utilizada a técnica de SSH (*Suppression Subtraction Hybridization*) em panículas de arroz.

Capítulo 1:

An insertional mutation in *OsYSL15* leads to up-regulation of diverse iron uptake genes in rice.

An insertional mutation in *OsYSL15* leads to up-regulation of diverse iron uptake genes in rice.

Guilherme L. Duarte¹, Raul A. Sperotto¹, Tatiana Boff¹, Karina L. Lopes¹, Edilena R. Sperb¹, Janette P. Fett^{1,2*}

¹Centro de Biotecnologia and ²Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.O. Box 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author

E-mail address: jpfett@cbiot.ufrgs.br

Tel: 55-51-3308-7643

Fax: 55-51-3308-7309

Abstract

Rice is consumed all over the world, but it is a poor source of vitamins, proteins and micronutrients, such iron and zinc. Many efforts have been employed in attempts to generate more nutritive rice cultivars without success. The knowledge about how rice plants take up metals from soil, transport through the plant organs and store them inside cells is essential for a successful approach. In this study, we used rice mutant plants containing a *TOS17* insertion in the *OsYSL15* gene. The insertion site is localized in the promoter region and it is responsible for a five fold decrease in the expression of the interrupted gene under iron deficiency. *OsYSL15* is an iron transporter expressed mainly in roots and is responsible for Fe⁺³-DMA uptake from soil.

Although *ysl15* plants do not express *OsYSL15* normally, the plants don't show any visual phenotype; the mutant seeds germinate as well as wild type ones and can accumulate more iron and zinc than wild type seeds. Quantitative RT-PCR revealed that *ysl15* plants, when submitted to iron deficiency, can induce other genes known to be involved in iron uptake (*OsYSL2* and *OsIRT1*) and other metal homeostasis-candidate genes (*OsYSL10* and *OsMTP1*). Expression of these genes is higher in mutant plants than in WT plants, possibly compensating the effects of lower *OsYSL15* expression. The redundancy of genes from different metal uptake strategies seems to be the answer for the viability of *YSL15* plants.

Introduction

Rice (*Oryza sativa*) is the major staple food for over half of the world population, being consumed as the dietary basis in many cultures. Unfortunately, rice is a poor source of nutrients and vitamins (Narayanan et al, 2007). It's been estimated that zinc and iron deficiency affects over three billion people worldwide, particularly in developing countries (Welch and Graham, 2004). In order to overcome these low levels of nutrients in grains, many efforts have been devoted to develop new cultivars with higher iron and other micronutrients concentration (Bouis, 2003). Although many studies focusing on how plants acquire micronutrients from the soil have been published in the last years, little is known about how is the trafficking of these micronutrients inside the plant and specially into the grain.

Iron is an essential micronutrient for almost all living organisms; plants play an important role in its entry in the food chain (Sperotto et al, 2007). In plants, iron participates in many cellular functions, such as chlorophyll synthesis, photosynthesis and respiration. Although iron is a very abundant micronutrient in the Earth crust, under aerobic conditions it is very insoluble (as several Fe^{+3} forms), and not readily available

for plants (Guerinot and Yi, 1994). To overcome this barrier, plants developed two strategies for iron uptake under iron deficiency (Marschner et al, 1986; Mori, 1999). Strategy I, used by all plants except grasses, is based on the release of protons into the rhizosphere to lower the pH, and induction of an Fe^{+3} -chelate reductase and of a transporter for the uptake of the resulting Fe^{+2} . Strategy II, employed by grasses, is based on the secretion of phytosiderophores into the rhizosphere. These phytosiderophores are small molecules from the mugineic acid (MA) family, which are natural metal chelators (Suzuki et al, 2008). The resulting metal-MA is carried into the plant via specific transporters. In maize (*Zea mays*) the high affinity transport of Fe^{+3} -MA is mediated by Yellow Stripe 1 (Curie et al, 2001; Schaff et al, 2004).

There are 18 putative Yellow Stripe 1 homologues in the rice genome (Yellow Stripe Like – *OsYSL*, Gross et al, 2003). *OsYSL2* is expressed in Fe-deficient leaves and roots, and encodes an Fe^{+2} -nicotinamine and Mn^{+2} -nicotianamine transporter (Koike et al, 2004). Although *OsYSL2* is expressed in roots, it is probably not involved in metal uptake, but rather in metal translocation, since it is mostly expressed in phloem cells (Koike et al, 2004). *OsYSL15* transports Fe^{+3} -DMA and is expressed mainly in roots of Fe-deficient plants, being considered the dominant Fe^{+3} -Deoxy Mugineic Acid transporter responsible for iron uptake from the rhizosphere in rice (Inoue et al, 2009). It was also shown to be expressed in developing seeds and during seed germination (Inoue et al, 2009).

Rice has become the first monocot model plant, next to the dicot model *Arabidopsis thaliana*. In the last years, rice gained new status in scientific research and several genomic tools started to be developed for this model. The retrotransposon *TOS17* has been used as an efficient tool to generate mutant lines. *TOS17* is highly activated by tissue culture (Hirochika et al, 1996), and preferentially inserts into low copy number regions of the genome (Yamazaki et al, 2001). In this study, we compare the

responses of wild type plants and an *OsYSL15* mutant (*ysl15* plants) in an attempt to better understand the iron homeostasis in rice plants.

Materials and methods

Plant materials and growth conditions

Rice plants with an insertion of the *TOS17* transposable element in the *OsYSL15* gene were identified in the mutant database of Rice Genome Research Center (<http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/>) using the Basic Local Alignment Search Tool (*BLAST*). Seeds were requested and germinated in petri dishes with distilled water and transferred to pots with soil. To determine the genotypes of plants, we used specific PCR primer sets for sequences from the *OsYSL15* gene which flank the insertion site of the *TOS17* element and a specific primer for the *TOS17* tail sequence (figure 1C and D). The identified homozygous plants containing *TOS17* insertion in both copies of the *OsYSL15* gene and WT rice plants from cultivar Nipponbare were grown in tanks with soil until reproductive stage for two generations. The F3 seeds harvested from *OsYSL15* mutant plants (*ysl15*) and Nipponbare plants (wild type plants – WT) were used in the experiments. Both WT and *ysl15* seeds were germinated for 4 days in a BOD chamber (28°C, first two days in the dark and last two days in the light) on paper soaked with distilled water. After germination, plants were transferred to pots containing Yoshida solution (Yoshida, 1976) with 28°C, 16h light/ 26°C, 8h dark cycle. The solutions were replaced every 3 days. After fifteen days, plants were submitted to either control condition (CC) or iron-deficiency condition (Fe-), where control condition is the complete Yoshida solution and iron-deficiency is Yoshida solution without iron supply. Roots and shoots were harvested at the onset of the treatments and after 3 days of Fe-deficiency, for YSL genes expression and elemental analyses.

Mean germination time

Seeds of wild type and *ys1/15* plants were germinated in petri dishes containing distilled water. The germination was registered every day, for 5 days, with a seed being considered germinated when its root was longer than 1mm. Germination was expressed as a percentage of the number of seeds originally set to germinate. The mean germination time (MGT) was calculated as described by Nichols and Heydecker (1968).

Elemental analysis by ICP

Seeds from plants cultivated in tanks with soil and shoots from the laboratory iron-deficiency experiment were dried in a 60° C oven for 48 h. Dried tissues were predigested overnight in borosilicate glass tubes with 4 ml of redistilled 98.8% HNO₃. One milliliter of concentrated trace metal grade HClO₄ was added to the predigested seeds and heated at 100° C for 1 h, 150° C for 1 h, 180° C for 1 h and then at 210° C to dryness (1-2 h). Digestions were performed using a heating block (Model 1016, Tecator, Hoganas, Sweden) with an exhaust-collecting manifold. Digests were resuspended in 15 ml of redistilled 2% HNO₃. Elemental analysis was performed using inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (CIROS ICP Model FCE12; Spectro, Kleve, Germany). Tomato leaves and rice flour standards (SRM 1573A and 1568A, respectively; National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD) were digested and analyzed along with the rice samples to ensure accuracy of the instrument calibration.

RNA extraction and cDNA synthesis

Rice roots were used for total RNA extraction using Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen) and treated with DNase I (Invitrogen), to remove any contaminating DNA. First-strand cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (M-MLV, Invitrogen) using 1 µg of RNA.

Quantitative RT-PCR and data analysis

qRT-PCRs were carried out in an Applied-Biosystem 7500 real-time cycler. All primers (listed in Table 1) were designed to amplify 100–150 bp of the 3'-UTR of the genes and to have similar T_m values (60° C). Reaction settings were composed of an initial denaturation step of 5 min at 94°C, followed by 40 cycles of 10 s at 94°C, 15 s at 60°C, 15 s at 72°C and 35 s at 60°C; samples were held for 2 min at 40°C for annealing and then heated from 55 to 99°C with a ramp of 0.1°C/s to acquire data to produce the melting curve of the amplified products. qRT-PCRs were carried out in 20 µl final volume composed of 10 µl of each reverse transcription sample diluted 100 times, 2 µl of 10X PCR buffer, 1.2 µl of 50 mM MgCl₂, 0.1 µl of 5 mM dNTPs, 0.4 µl of 10 µM primer pairs, 4.25 µl of water, 2.0 µl of SYBR green (1:10.000 Molecular Probe), and 0.05 µl of Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µl) (Invitrogen). Gene expression was quantified using the comparative C_T (threshold cycle) method (Livak and Schmittgen, 2001). For each sample, analyzed in triplicate, a ΔC_T value was obtained by subtracting the Ubiquitin C_T value from the C_T of the gene of interest. Expression values were normalized in relation to the PCR efficiency of the exponential phase from each individual amplification.

OsYSL15 responses to zinc-deficiency

Fifteen days-old plants were submitted to either control condition (CC) or zinc-deficiency condition (Zn-), where control condition is the complete Yoshida solution and zinc-deficiency is Yoshida solution without zinc supply. Roots were harvested at the onset of the treatment and after 3 days of zinc-deficiency treatment.

OsYSL15 responses to different iron forms

Fifteen days-old plants were submitted to either control condition (CC) or iron-deficiency condition (Fe-) for 3 days. After that period, plants submitted to the iron-deficiency treatment were re-supplied with Yoshida solution containing Fe⁺²-EDTA or Fe⁺³-EDTA in a concentration equivalent to half the Fe concentration in the control condition or maintained under iron deficiency for another three day period.

Statistical analyses

When appropriate, data were subjected to ANOVA and means were compared by the Duncan or Student's *t* test ($P \leq 0.05$ and 0.01) using the SPSS Base 12.0 for Windows (SPSS Inc., USA).

Results and discussion

OsYSL15 mutant plants by TOS17 insertion

The *OsYSL15* mutant line identified in the mutant bank (line NG3543) contains the *TOS17* insertion in the promoter region (Figure 1A). The *OsYSL15* expressed protein is localized in the plasma membrane (Inoue et al, 2009) and contains 12 transmembrane

domains predicted with ConPred II (<http://bioinfo.si.hirosaki-u.ac.jp/~ConPred2/>) (Figure 1B). All seeds (20) received from the RGRC mutant bank were germinated and plants tested for *TOS17* insertion following the mutant bank instructions (Figure 1C). Four plants were identified as homozygous for the *TOS17* insertion in the *OsYSL15* gene (Figure 1D).

The F3 mutant seed has higher iron and zinc concentrations than seeds from wild type plants (Figure 2A). In contrast, there is no difference in shoot concentrations of these two elements between *ysl15* and WT plants (Figure 2B). When comparing percentage of germination and mean germination time (MGT) of *ysl15* and WT seeds, we observed no difference between mutant and wild type seeds (Figure 2C – D). In fact, *ysl15* seedlings develop as well as wild type. These results contrast with a recent report, in which Inoue et al (2009) generated *OsYSL15* silenced rice plants using the RNAi technique. These transgenic plants were considered as *OsYSL15* knockdown and exhibited severe growth defects during germination and seedling development. One possible explanation for this is the fact that the authors used a very large fragment (209pb) to generate *OsYSL15* knockdown plants. Since there are 18 YSL members in rice, which share large similarity, the authors may be affecting the expression of other YSL members. Expression of only three other YSL genes (*OsYSL2*, *OsYSL9* and *OsYSL16*) was evaluated in those reported mutant plants.

In order to certify that the *TOS17* insertion in the *OsYSL15* promoter region was really affecting its expression, we performed quantitative RT-PCR analysis in WT and mutant plants subjected to iron deficiency. Consistent with previous reports (Koike et al, 2004; Kobayashi et al, 2005; Inoue et al, 2009), *OsYSL15* expression was strongly up-regulated in roots of wild type plants submitted to iron deficiency. However, *ysl15* plants exhibited very low transcript levels (Figure 3A), confirming that the *TOS17* insertion is really affecting *OsYSL15* expression in mutant plants.

The *ysl15* plants did not show any visual phenotype and accumulated more iron and zinc in seeds when cultivated in soil. This suggests that *ysl15* plants are able to induce a compensatory mechanism which allows normal growth and development despite the lack in *OsYSL15* expression. To test this hypothesis, we performed quantitative RT-PCR analysis of other YSL family members and other genes considered candidates to participate in iron homeostasis. Expression of nine genes was evaluated besides *OsYSL15* expression (Figures 3 and 4). The more interesting results were observed for *OsYSL2*, *OsYSL10*, *OsIRT1* and *OsMTP1*. The expression of these four genes was up-regulated by iron deficiency, mainly in *ysl15* plants (Figure 3B – E). In fact, *OsYSL2* is known to be a metal-nicotianamine transporter expressed in roots, more specifically in phloem companion cells, and might be involved in iron translocation, but not iron uptake from the soil (Koike et al, 2004). *OsIRT1* is a strategy I gene capable of transporting Fe⁺²-nicotianamine (Buglio et al, 2002). *OsMTP1* is an *AtMTP1* ortholog, which has been demonstrated to transport zinc from the cytosol into the vacuole and is involved in zinc detoxification (Kobae et al, 2004; Desbrosses-Fonrouge et al, 2005). These results suggest that the lack of *OsYSL15* expression in *ysl15* plants can be compensated by the induction of other metal-acquisition-related genes, which could also be responsible for the higher iron and zinc concentrations seen in seeds. Moreover, the induction of *OsMTP1* suggests that *ysl15* and wild type plants are transporting zinc in an unspecific way.

Since *OsMTP1* expression is increased in both *ysl15* and wild type plants, it may be indicating that zinc uptake could be occurring by different ways: in wild type plants by unspecific transport mediated by *OsYSL15*, which is strongly up-regulated by iron deficiency; in *ysl15* plants due to the activation of a number of genes involved in metal uptake, including *IRT1*, which is known to also transport zinc and cadmium in *Arabidopsis thaliana* (Korshunova et al, 1999; Vert et al, 2001; Vert et al, 2002). It is possible that the activity of such “compensatory” transporters in *ysl15* mutant plants

results in increased unspecific zinc uptake into root cells. Increased zinc concentrations would then trigger higher expression of the *OsMTP1* gene, to provide zinc storage within the vacuole. Expression of the other YSL members analyzed was considered too low to make any relevant contribution in response to iron deficiency, mostly below 10% of the Ubiquitin gene expression levels (Figure 4).

OsYSL15 responses to zinc and different iron forms

There are no reports in the literature regarding the capability of the *OsYSL15* transporter to mediate zinc uptake. Before this possibility is tested, the above-mentioned hypothesis is based only on our indirect evidence. Considering the *OsYSL15* protein as a potential zinc transporter, we investigated the effect of zinc deficiency on its gene expression. *OsYSL15* expression was not induced by zinc deficiency (Figure 5), consistent with a previous report (Inoue et al, 2009). Therefore, if able to mediate zinc transport, *OsYSL15* would probably have higher affinity for iron than for zinc, since its expression is induced by iron deficiency, and zinc transport would be a secondary, possibly unspecific role.

To better understand the regulation of the *OsYSL15* gene, we evaluated its expression in wild type plants submitted to iron deficiency and recovery with different iron forms (Fe^{+2} -EDTA or Fe^{+3} -EDTA). *OsYSL15* expression has no difference when recovery is achieved with either iron form (Figure 6). This may be explained by the redundancy of strategy I and II genes expressed in rice. Plants could be transporting Fe^{+3} by *OsYSL15* transporter or Fe^{+2} by strategy I transporter genes, such as *OsIRT1* gene. Other possibility is that other unknown transporters could be acting in iron uptake.

Although *OsYSL15* is very important for iron uptake under Fe-deficiency, the results obtained in this study suggest that *OsYSL15* isn't the only transporter capable of supplying the rice plants demand for iron, since *ys/15* plants grow normally under iron-

sufficient or –deficient conditions. Actually, the induction of genes from both iron uptake strategies seems to overcome the defect of *ys/15* plants.

References

Bouis HE (2003) Micronutrient fortification of plants through plant breeding: can it improve nutrition in man at low cost? Proc. Nutr. Soc. 62 403e411.

Bughio N, Yamaguchi H, Nishizawa NK, Nakanishi H, Mori S (2002) Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. Journal of Experimental Botany 53, 1677-1682.

Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL (2001) Maize *yellow stripe1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. Nature 409: 346-349.

Desbrosses-Fonrouge A-G, Voigt K, Schröder A, Arrivault S, Thomine S, and Krämer U (2005) Arabidopsis thaliana MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. FEBS Lett. 579, 4165-4174

Guerinot ML, Yi Y (1994). Iron: nutritious, noxious, not readily available. Plant Physiology, v. 104, p.815-820.

Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H, Kanda M (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proc Natl Acad Sci USA 93:7783-7788.

Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, Takahashi M, Kakei Y, Suzuki K, Nakazono M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2009) Rice OsYSL15 is an Iron-regulated Iron(III)-Deoxymugineic Acid Transporter Expressed in the Roots and is Essential for Iron Uptake in Early Growth of the Seedlings. J. Biol. Chem. 284: 3470 - 3479.

Kobae Y, Uemura T, Sato MH, Ohnishi M, Mimura T and Mae-shima M (2004) Zinc transporter of Arabidopsis thaliana AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. Plant Cell Physiol. 45, 1749-1758.

Kobayashi T, Suzuki M, Inoue H, Itai RN, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. (2005) Expression of iron-acquisition-related genes in iron-deficient rice is co-ordinately induced by partially conserved iron-deficiency-responsive elements. J Exp Bot. 56(415):1305-16.

Koike S, Inoue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. Plant J. 39(3):415-24.

Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol.* 40(1):37-44.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods* 25: 402-408.

Marschner H, Römheld V, Kissel M(1986)Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9,695–713.

Mori S (1999) Iron acquisition by plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 250–253.

Narayanan NN, Vasconcelos MW, Grusak MA (2007) Expression profiling of *Oryza sativa* metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray. *Plant Physiol Biochem* 45: 277-286.

Nichols, M.A., Heydecker, W. (1968) Two approaches to the study of germination data. *Proceeding of International Seed Testing Association* 33, 340351.

Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu BE, Mori S, Kitahara T, vonWiren N (2004) ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phyto siderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J. Biol. Chem.* 279, 9091–9096.

Sperotto RA, Ricachenevsky FK, Fett JP (2007) Iron deficiency in rice shoots: identification of novel induced genes using RDA and possible relation to leaf senescence. *Plant Cell Rep* 26: 1399-1411.

Suzuki K, Higuchi K, Nakanishi H, Nishizawa NK, Mori S (1999) Cloning of nicotianamine synthase genes from *Arabidopsis thaliana*. *Soil Sci. Plant Nutr.* 45, 99–1002.

Suzuki M, Tsukamoto T, Inoue H, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2008) Deoxymugineic acid increases Zn translocation in Zn-deficient rice plants. *Plant Mol Biol.* 2008

Vert G, Briat JF, Curie C (2001) *Arabidopsis* IRT2 gene encodes a root-periphery iron transporter. *Plant J.* 26(2):181-9.

Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell.* 14(6):1223-33.

Welch RM, Graham RD (2004) Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J Exp Bot* 55: 353-364.

Yamazaki M, Tsugawa H, Miyao A, Yano M, Wu J, Yamamoto S, Matsumoto T, Sasaki T, Hirochika H (2001) The rice retrotransposon Tos17 prefers low- copy- number sequences as integration targets. *Mol Genet Genomics* 265:336344

Table 1. Gene-specific PCR primers used for qRT-PCR.

Gene	Forward primer 5' → 3'	Reverse primer 5' → 3'
<i>OsYSL2</i>	AAGATTTAGGCGCAGCGAGA	ACACAGTACAGAACCCCAACC
<i>OsYSL5</i>	CATGTCCTTCAGGCCATCTT	GGACAACGGCTCTATTCCAA
<i>OsYSL6</i>	TGTGCATGTACTTCAAGCCATC	AAGAACAAAGTTACTGCACTTTTGC
<i>OsYSL7</i>	AAGTTGGACGCCTTCTTGG	CAGTTTGCCACGACTCCTAA
<i>OsYSL10</i>	CCCCTCCTCCTAGCTACCAT	CATGCGGGCTACTAGCAAAG
<i>OsYSL15</i>	GGATGGCCTGTACCATTTTG	ATCACCTCCTCTGATGCTG
<i>OsYSL16</i>	ACAGCGTCAATGCAGACGTA	GAACCCCAACCCCTATGAAC
<i>OsYSL18</i>	TCTTGATCGAGGAAGAAGTGG	TGCCATAGTATGTTCGTTGGA
<i>OsIRT1</i>	GCAATTCGCTGCATTGTTAG	GAAGTACATCATCAGTCACGAA
<i>OsMTP1</i>	TTCAGGCACCTGTGAGTACG	ATTATTTCCCATGCCAGTGC
<i>OsUBQ</i>	AACCAGCTGAGGCCCAAGA	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA

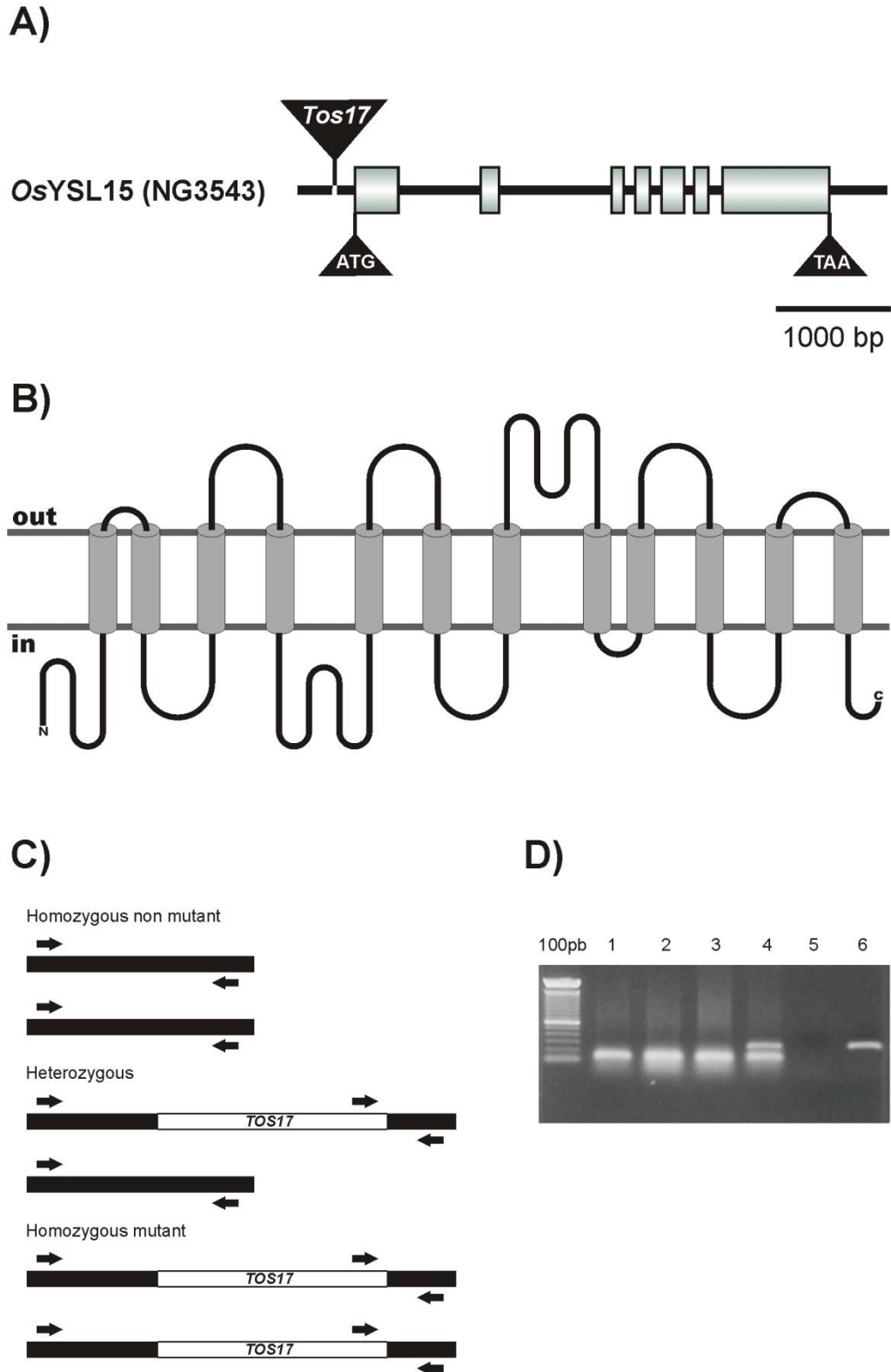


Figure 1. Identification of mutant plants containing a *TOS17* insertion in the *OsYSL15* gene. A) Schematic representation of *OsYSL15* gene with *TOS17* insertion site. Gray boxes indicate exons. B) Schematic representation of the membrane embedded protein encoded by *OsYSL15*. C) Schematic representation of the three-primer PCR

reaction used for identification of *ys/15* homozygous mutant plants. D) PCR reaction used to identify *ys/15* mutant plants: lanes 1, 2 and 3 - *ys/15* homozygous mutant plants; lane 4 – heterozygous plants; lane 5 – negative control; lane 6 – wild type plants.

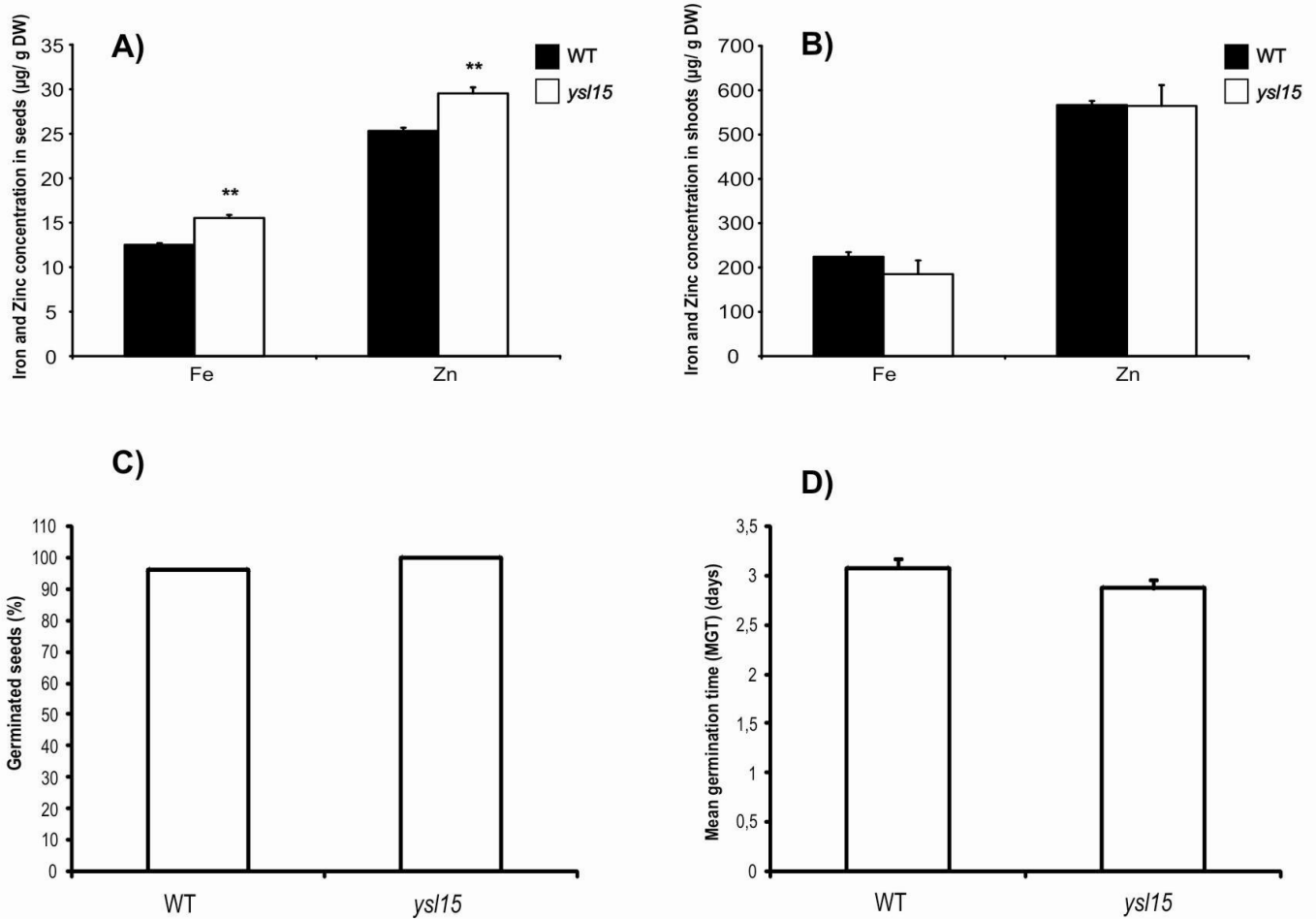


Figure 2. A) Iron and zinc concentrations in de-husked seeds of wild type plants (WT) and *ysl15* mutant plants (*ysl15*) determined by ICP-OES. Plants were cultivated in tanks with soil. B) Iron and zinc concentration in shoots of wild type plants and *ysl15* mutant plants (*ysl15*) measured by ICP. 15 days old plants were cultivated in laboratory conditions with Yoshida solution. C) Percentage of germinated seeds from wild type plants (WT) and *ysl15* mutant plants (*ysl15*). D) Mean germination time (MGT) of germinated seeds of wild type plants (WT) and *ysl15* mutant plants (*ysl15*). Values are the average of three samples \pm SE. Means with * or ** are different by Student's *t* test ($P \leq 0.05$ or $P \leq 0.01$, respectively).

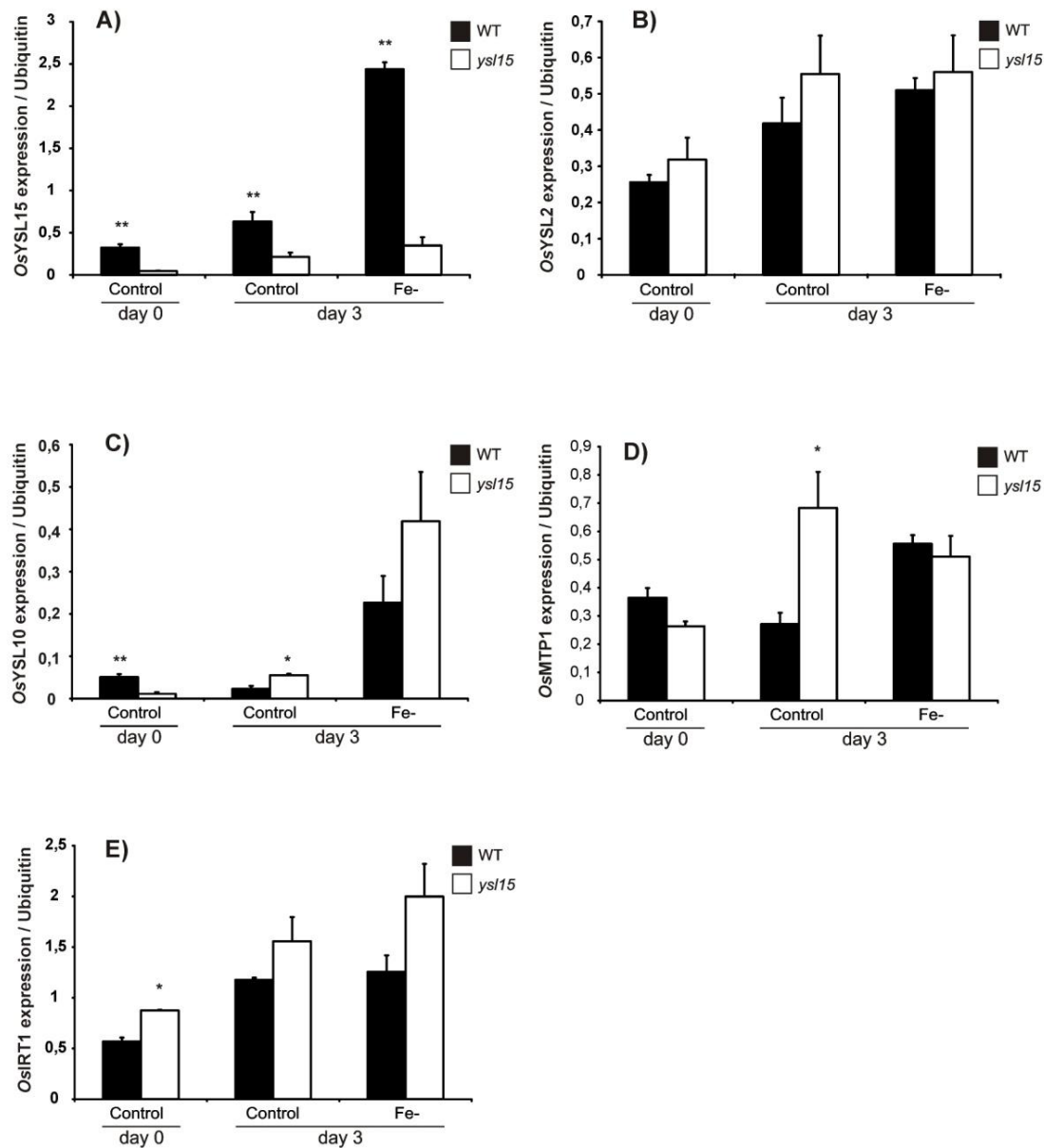


Figure 3. Real-time RT-PCR expression analysis in roots of wild type (WT) and *ysl15* mutant plants (*ysl15*). Plants were grown on Yoshida solution for 15 days, then maintained on control condition (Yoshida solution) or transferred to iron deficient treatment (Yoshida solution without Fe) for 3 days. The relative mRNA expression values were determined relative to Ubiquitin. Values are the averages of three samples \pm SE. Means with * or ** are different by Student's *t* test ($P \leq 0.05$ or $P \leq 0.01$, respectively), comparing the two genotypes within each time and treatment. A) *OsYSL15*; B) *OsYSL2*; C) *OsYSL10*; D) *OsMTP1*; E) *OsIRT1*.

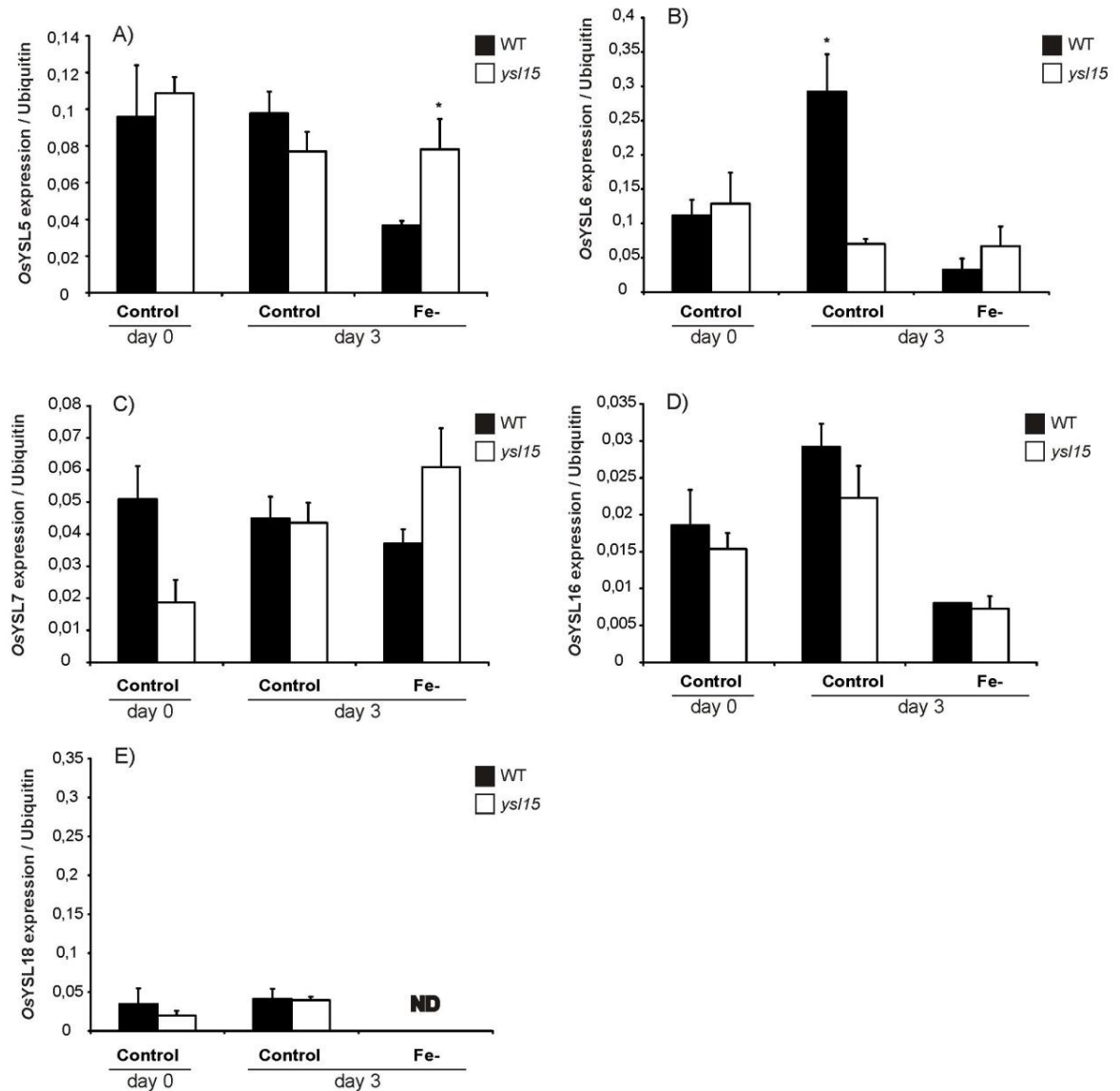


Figure 4. Real-time RT-PCR expression analysis in roots of wild type (WT) and *ysl15* mutant plants (*ysl15*). Plants were grown on Yoshida solution for 15 days, then maintained on control condition (Yoshida solution) or transferred to iron deficient treatment (Yoshida solution without Fe) for three days. The relative mRNA expression values were determined relative to Ubiquitin. Values are the averages of three samples \pm SE. Means with * or ** are different by Student's *t* test ($P \leq 0.05$ or $P \leq 0.01$, respectively), comparing the two genotypes within each time and treatment. A) *OsYSL5*; B) *OsYSL6*; C) *OsYSL7*; D) *OsYSL16*; E) *OsYSL18*.

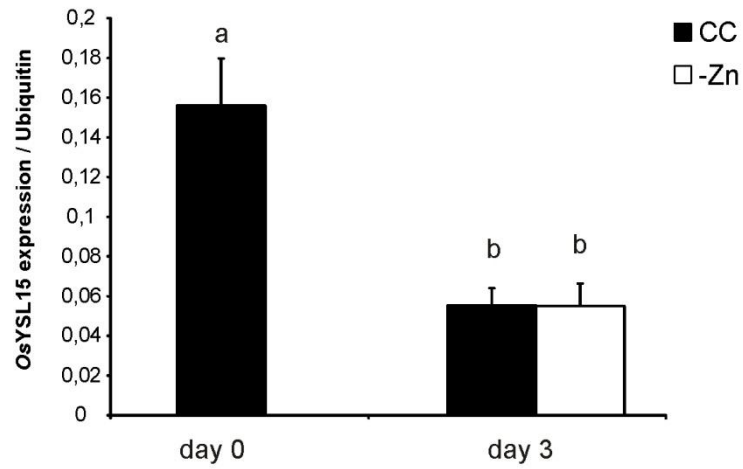


Figure 5. Real-time RT-PCR expression analysis of the *OsYSL15* gene in roots of Nipponbare rice plants. Plants were grown on Yoshida solution for 15 days, then maintained on control condition (Yoshida solution) or transferred to zinc deficient treatment (Yoshida solution – Zn) for 0 to 3 days. The relative mRNA expression values were determined relative to Ubiquitin. Values are the averages of three samples \pm SE. Means with different letters indicate differences by the Duncan test ($P \leq 0.05$).

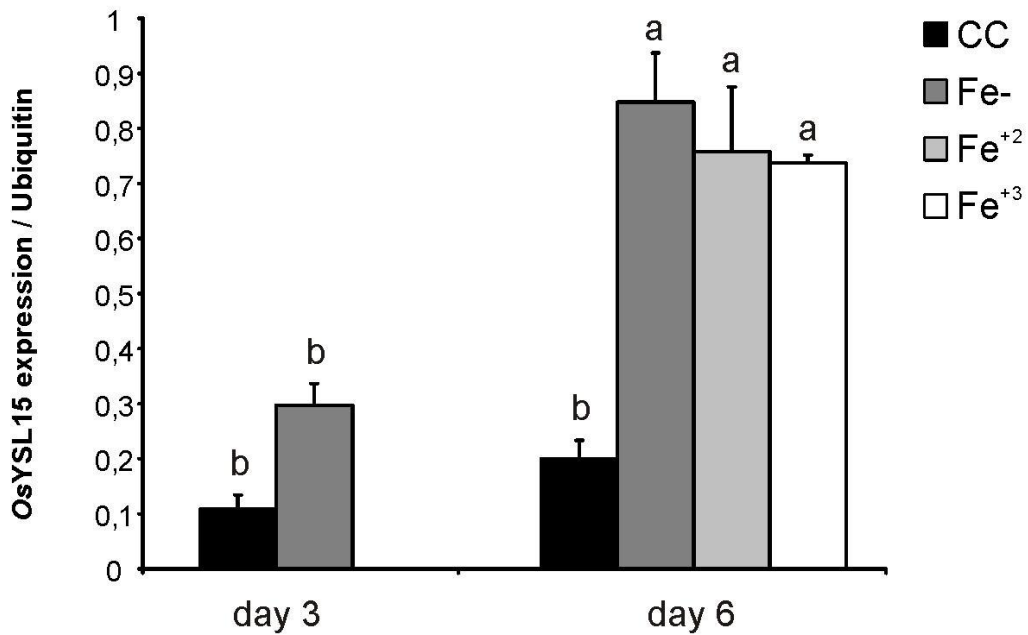


Figure 6. Real-time RT-PCR expression analysis of *OsYSL15* in roots of wild type Nipponbare rice plants. Plants were grown on Yoshida solution for 15 days, then maintained on control condition (Yoshida solution) or transferred to iron deficiency for three days. Plants submitted to iron deficiency were treated with Fe⁺²-EDTA or Fe⁺³-EDTA for three more days. The relative mRNA expression values were determined relative to Ubiquitin. Values are the averages of three samples \pm SE. Means with different letters indicate differences by the Duncan test ($P \leq 0.05$), comparing all means in the same analysis.

Capítulo 2:

Análise da expressão de genes *Yellow Stripe Like* em folhas bandeira e panículas de arroz em dois estádios de desenvolvimento dos grãos

Introdução

Os processos envolvidos no enchimento dos grãos de cereais são pouco compreendidos. O entendimento de como estes processos ocorrem e quais genes são responsáveis pelo transporte de nutrientes são de extrema importância para programas de melhoramento e engenharia genética. Em arroz, durante o desenvolvimento reprodutivo, as folhas bandeira são responsáveis por nutrir as panículas com fotoassimilados (Grusak e DellaPenna, 1999 apud Narayanan et al, 2007).

Os genes *YSL*, por pertencerem a uma família de transportadores de metais, são genes candidatos a participarem deste processo. Já foi demonstrado experimentalmente que os genes *OsYSL2* e *OsYSL15* são expressos em grãos e endosperma de arroz durante o desenvolvimento das sementes (Koike et al, 2004; Inoue et al, 2009), entretanto não se sabe se estes genes são essenciais ou limitantes para a nutrição dos grãos de arroz. Muitos trabalhos têm focado na questão de quais genes são expressos durante o desenvolvimento reprodutivo das plantas, entretanto com resultados pouco conclusivos. O objetivo deste capítulo é verificar se existe relação entre a expressão de algum dos genes *YSL* durante o enchimento dos grãos com os valores de concentração de ferro e zinco em grãos. Para tanto, utilizamos a técnica de PCR em tempo real, que é bastante sensível e confiável.

Materiais e métodos

Material vegetal.

Plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) foram cultivadas em campo, na estação experimental do IRGA (Instituto Rio Grandense do Arroz) em Cachoeirinha (29° 54' 58.61"S 51° 10' 02.65"W) na safra 2006/07. Durante o desenvolvimento reprodutivo foram coletadas panículas e folhas bandeira nos estádios R3 (estádio *Reprodutivo 3* – fase de emborrachamento; a panícula ainda está envolta por uma bainha) e estágio R5 (estádio *Reprodutivo 5* – fase em que a panícula já emergiu e está ocorrendo o enchimento do grão), de acordo com a classificação de Counce et al (2000).

Para as análises em folhas bandeira, foram utilizadas as cultivares Canastra, BR-IRGA 409, BR-IRGA 421, IR68144-2B-2-2-3-1-120, IR68144-2B-2-2-3-1-166, IR69428-6-1-1-3-3, IR75862-206-2-8-3-B-B-B, IR75862-221-2-1-2-B-B-B, sendo estas cinco últimas provenientes do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) e serão tratadas neste capítulo, para facilitar a identificação das cultivares, por CIAT1, CIAT2, CIAT3, CIAT4 e CIAT5, respectivamente. Para as análises em panículas foram utilizadas plantas das cultivares Canastra, CIAT1, CIAT3 e CIAT4. Todos os tecidos coletados para avaliação da expressão gênica por qRT-PCR foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20°C. Cada tipo de tecido (cultivar/ estágio reprodutivo) foi representado por três amostras, sendo cada amostra composta por tecidos de três plantas diferentes.

Sementes de plantas que chegaram ao estágio R9 (estádio reprodutivo 9 – sementes maduras, segundo Counce et al (2000)), foram coletadas para quantificação da concentração de metais por ICP-OES.

Análise de elementos por ICP-OES

Sementes de nove plantas de cada uma das quatro cultivares foram coletadas e secas em estufa a 60°C por pelo menos 48 horas. As amostras secas foram preparadas de acordo com o método descrito por Narayanan et al (2007). As análises de elementos foram realizadas usando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*ICP-OES - inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy*) (CIROS ICP Model FCE12; Spectro, Kleve, Germany). Para verificar a precisão de calibração do equipamento, foram analisados padrões de folhas de tomate e farinha de arroz (SRM 1573A e 1568A, respectivamente; National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD) juntamente com as amostras de sementes de arroz. Estas análises foram realizadas no laboratório do Dr. Michael Grusak, USDA, Houston, USA.

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total dos tecidos foi extraído utilizando o kit Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen). Um micrograma de RNA total foi tratado com DNase I (Invitrogen), para evitar qualquer contaminação com DNA. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit SMART PCR cDNA Synthesis Kit by Clontech Laboratories (Palo Alto, CA, USA), seguindo instruções do fabricante. Para síntese da primeira fita de cDNA foi utilizada a transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen).

Avaliação da expressão de genes Yellow Stripe Like por RT-PCR em Tempo Real

RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR) foram conduzidas utilizando o equipamento Applied-Biosystem 7500 Real-Time PCR System. Os *primers* utilizados (tabela 1) foram projetados na região 3' não traduzida (3'-UTR), com T_m igual a 60°C. As

reações foram configuradas com 5 minutos de desnaturação, inicialmente a 94°C , seguidos de 40 ciclos de 10 s a 94°C, 15 s a 60°C e 15 s a 72°C. Ao fim de cada reação foi realizada a curva de desnaturação (*melting curve*) na qual cada amostra era mantida a 40°C por 2 minutos, para hibridização das duplas fitas amplificadas, e aquecidas de 55°C a 99°C com aumento de temperatura de 0,1°C por segundo. Cada reação tinha volume final igual a 20 µl, na qual 10 µl eram de cDNA de cada amostra diluída 100 vezes, 2 µl de tampão PCR 10X, 1.2 µl de MgCl₂ 50 mM, 0.1 µl de dNTPs 10 mM, 0.4 µl do par de primers 10 µM, 4.25 µl de água, 2.0 µl de SYBR green (1:10.000 Invitrogen) e 0.05 µl de Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µl, Invitrogen). A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método de comparação do Ct (threshold cycle) (Livak and Schmittgen, 2001), utilizando a eficiência de amplificação de cada amostra. Cada amostra foi analisada em triplicata e o valor de ΔC_T foi obtido pela subtração do valor de Ct do gene de interesse do valor de Ct obtido para a expressão do gene da Ubiquitina para a mesma amostra.

Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($P \leq 0.05$), usando-se o software SPSS Base 12.0 for Windows (SPSS Inc., USA). Cálculos de coeficientes de correlação de Pearson foram realizados usando-se o programa SAS.

Resultados e discussão

Concentração de ferro e zinco em sementes

A análise da concentração de ferro e zinco foi realizada em sementes maduras (estádio R9, segundo Counce et al, 2000) de todas cultivares utilizadas neste capítulo pela técnica de ICP-OES, com exceção da cultivar CIAT5, que não chegou ao estágio R9. As cultivares CIAT1, BR-IRGA 409, CIAT4, CIAT2 e CIAT3 apresentaram as concentrações mais elevadas de ferro em grãos, enquanto Canastra e BR-IRGA 421 apresentaram concentrações baixas deste elemento (Figura 1A). As cultivares com as maiores concentrações de ferro também apresentaram as maiores concentrações de zinco: CIAT4, CIAT2 e CIAT3 (Figura 1B). Alguns autores já relataram a existência de correlação entre as concentrações destes elementos e com a concentração de proteínas em grãos de cereais (Cakmak et al. 2004; Morgounov et al. 2007; Jiang et al. 2007; Distelfeld et al, 2007; Sperotto et al, comunicação pessoal).

Análise da expressão de genes YSL por RT-PCR em tempo real e correlação com ferro e zinco

Análises por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) foram realizadas em folhas bandeira e panículas de plantas de arroz em duas fases do enchimento dos grãos. Os resultados relativos às folhas bandeira estão mostrados nas figuras 2 e 3. Os dados estão apresentados posicionando-se as cultivares em ordem crescente de concentração final de ferro no grão (mesma ordem da figura 1A). Não foi possível verificar visualmente uma relação direta entre concentração de nutrientes e expressão gênica em folhas bandeira (Figuras 2 e 3). Alguns genes, como *OsYSL2*, *OsYSL6* e *OsYSL7*, apresentaram valores de expressão médios mais altos que os demais, mas não aparentando ter relação direta entre expressão e concentração de metais nos grãos.

Para investigar a relação existente entre expressão gênica e concentração de metais nos grãos foi realizado o teste de correlação de Pearson. Foi verificada correlação positiva entre os genes *OsYSL5*, *OsYSL14* e *OsYSL18* em algum dos estádios de desenvolvimento com zinco e/ou ferro (Tabela 2). O gene *OsYSL10* apresentou correlação negativa com ferro no estágio R5 e o gene *OsYSL8* apresentou correlação negativa com zinco na fase R3 (Tabela 2). Valores de correlação positiva podem indicar uma contribuição importante do gene em questão no transporte dos minerais avaliados, para dentro do floema das folhas bandeira, o que poderia levar ao maior aporte dos minerais para os grãos em formação ou em fase de enchimento. Por outro lado, correlações negativas podem indicar a atividade dos transportadores avaliados em etapas de compartimentalização subcelular dos minerais nas células da folha bandeira, diminuindo a disponibilidade de minerais disponíveis para o carregamento do floema.

O gene *OsYSL2*, um dos poucos da família *YSL* já caracterizados, é expresso principalmente em células do floema de raízes e folhas, podendo estar relacionado com o transporte de ferro (Koike et al, 2004). Em nossas análises, *OsYSL2* apresenta níveis de expressão relativamente altos em relação aos demais genes avaliados. Entretanto, a expressão deste gene em folha bandeira nos estádios estudados não apresentou correlação com concentrações de ferro ou zinco nos grãos maduros (Tabela 2).

A expressão do gene *OsYSL18* apresentou correlação com ferro no estágio R5 e com zinco nos estádios R3 e R5, atingindo os valores de correlação mais altos obtidos em nossas análises. Um estudo que corrobora nossos resultados foi realizado por Narayanan et al. (2007), que estudaram o padrão de expressão de genes envolvidos na homeostase de metais comparando o padrão de expressão de genes *YSL* em folhas bandeira e folhas não bandeira de arroz. Os resultados deste grupo sugerem

que a expressão do *OsYSL18* seja um fator limitante para o transporte de ferro aos grãos de arroz (Narayanan et al, 2007).

Em panículas, a avaliação da expressão gênica foi realizada apenas nas cultivares Canastra, CIAT1, CIAT3 e CIAT4. Os genes que apresentam valores de expressão mais elevados foram *OsYSL2*, *OsYSL6* e *OsYSL14* (Figuras 4 e 5). O gene *OsYSL2* já foi caracterizado como sendo expresso durante o desenvolvimento de grãos de arroz, apresentando sua expressão induzida gradativamente após a fase R4, sendo expresso principalmente no embrião e na camada mais externa do endosperma (Koike et al, 2004). Entretanto, apesar de apresentar correlação positiva entre os níveis de expressão em R5 com a concentração de zinco (Tabela 3), em todas as cultivares avaliadas em nosso estudo a expressão de *OsYSL2* foi mais elevada em R3 (Figura 4a). A expressão dos genes *OsYSL6* e *OsYSL7* em panículas apresentou correlação positiva com os teores de ferro em R3 e correlação com teor de zinco em R3 e R5. O gene *OsYSL14*, embora tenha apresentado correlação negativa com concentração de ferro no estágio R3, apresentou correlação positiva com concentração de zinco em R5. As correlações positivas entre concentrações de ferro e zinco nos grãos e níveis de expressão dos genes *YSL* nas panículas podem indicar a importância destes genes no transporte destes metais aos grãos, mais especificamente ao endosperma e embrião. Por exemplo, o gene *OsYSL2*, cujo envolvimento no desenvolvimento dos grãos já foi evidenciado, com expressão aumentada no embrião e na camada mais externa do endosperma após a antese (Koike et al, 2004), apresenta alta correlação entre sua expressão e concentração de zinco no estágio R5.

Da mesma forma que foi visto em folhas bandeira, o gene *OsYSL18*, embora não apresente uma expressão muito alta em panículas, pode ter uma relação com o teor de metais, sendo mais expresso no estágio R3 nas panículas de cultivares com maiores concentrações de ferro nos grãos (Figura 5C), apresentando correlação positiva com este metal em R3 e com zinco em R5 (Tabela 3).

Embora este trabalho tenha fornecido informações parciais sobre a expressão dos genes da família *YSL* durante o desenvolvimento dos grãos de arroz, e sugerido alguns genes como candidatos a desempenharem função mais importante neste processo, estudos adicionais envolvendo transportadores são de extrema importância para o entendimento dos mecanismos envolvidos na homeostase de metais em plantas de arroz, principalmente no transporte interno e alocação dos mesmos para as sementes. Embora ainda não sejam conhecidos os genes responsáveis pelo transporte de metais aos grãos, estudos desta natureza são fontes importantes de dados para futuros experimentos. Análises envolvendo um maior número de cultivares, com diferentes características nutritivas, podem ser úteis na investigação deste processo. Particularmente em relação às análises realizadas com panículas, provavelmente seria mais informativo avaliar a expressão dos mesmos genes em órgãos separados (pálea, lema, ráquila), evitando que a expressão diferencial em um órgão específico pudesse ter o seu efeito diluído pela expressão nos demais órgãos.

A análise e caracterização do gene *OsYSL18*, para o qual foram obtidos altos valores de correlação tanto em folha bandeira quanto em panícula, é de grande importância para entendimento de como esse gene possa estar atuando na alocação de nutrientes para os grãos de arroz. Nosso grupo espera encontrar um mutante para este gene nas coleções disponíveis à comunidade científica, para que possa solicitá-lo e caracterizá-lo.

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação de genes *YSL* em folhas bandeira e panículas de arroz.

Gene	Forward primer 5' → 3'	Reverse primer 5' → 3'
<i>OsYSL2</i>	AAGATTTAGGCGCAGCGAGA	ACACAGTACAGAACCCCAACC
<i>OsYSL5</i>	CATGTCCTTCAGGCCATCTT	GGACAACGGCTCTATTCCAA
<i>OsYSL6</i>	TGTGCATGTACTTCAAGCCATC	AAGAACAAAGTTACTGCACTTTTGC
<i>OsYSL7</i>	AAGTTGGACGCCTTCTTGG	CAGTTTGCCACGACTCCTAA
<i>OsYSL8</i>	CTCAAGCTAGCCTTCCATCG	TGCTACACCAGCTGCTTCTC
<i>OsYSL10</i>	CCCCTCCTCCTAGCTACCAT	CATGCGGGCTACTAGCAAAG
<i>OsYSL14</i>	CCGGTTAGTCGTGCCATC	ATCTGGAAATACATTTGGAGGAGA
<i>OsYSL15</i>	GGATGGCCTGTACCATTTTG	ATCACCTCCTCTGATGCTG
<i>OsYSL18</i>	TCTTGATCGAGGAAGAAGTGG	TGCCATAGTATGTTTCGTTGGA
<i>OsUBQ</i>	AACCAGCTGAGGCCCAAGA	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA

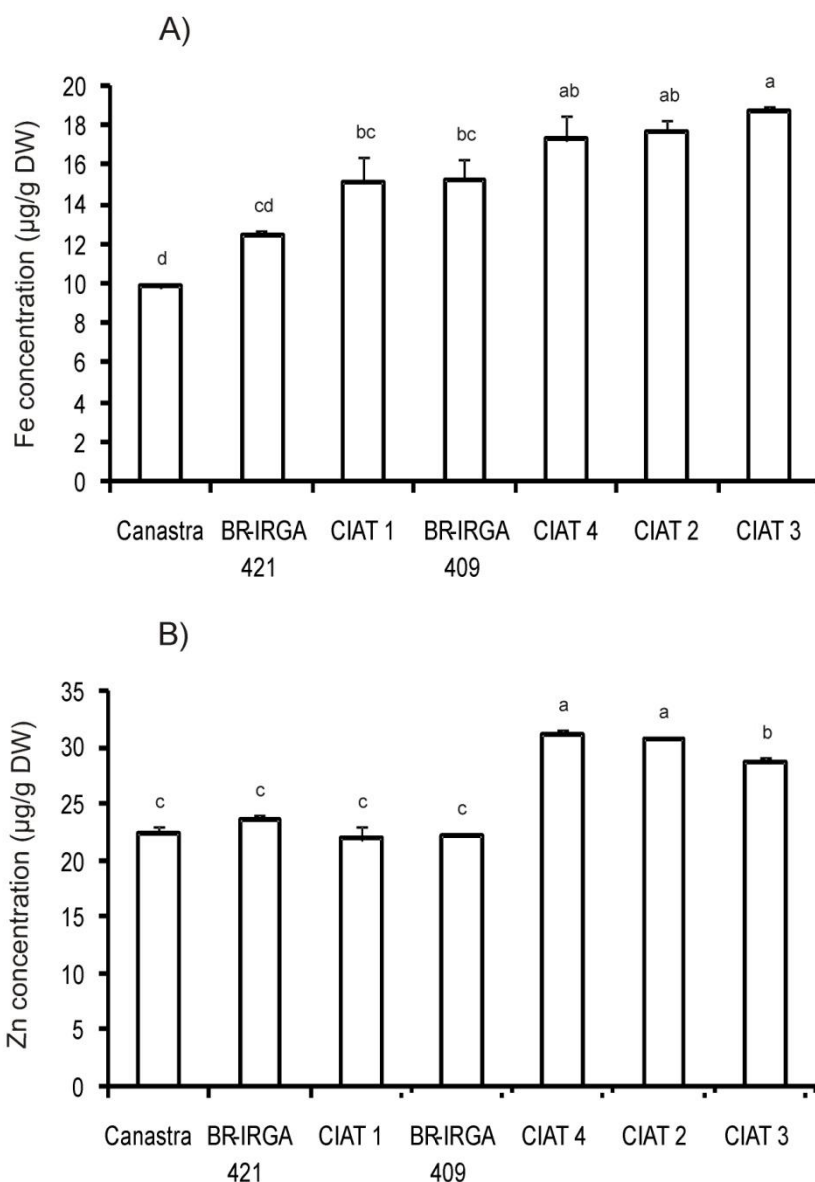


Figura 1. Concentração de ferro (A) e zinco (B) em sementes de sete cultivares de arroz. As sementes foram colhidas no estágio R9 (sementes maduras) e as análises foram realizadas utilizando a técnica de ICP-OES. Os valores são médias de três amostras \pm erro padrão. Letras minúsculas indicam o resultado do teste Duncan ($P \leq 0,05$).

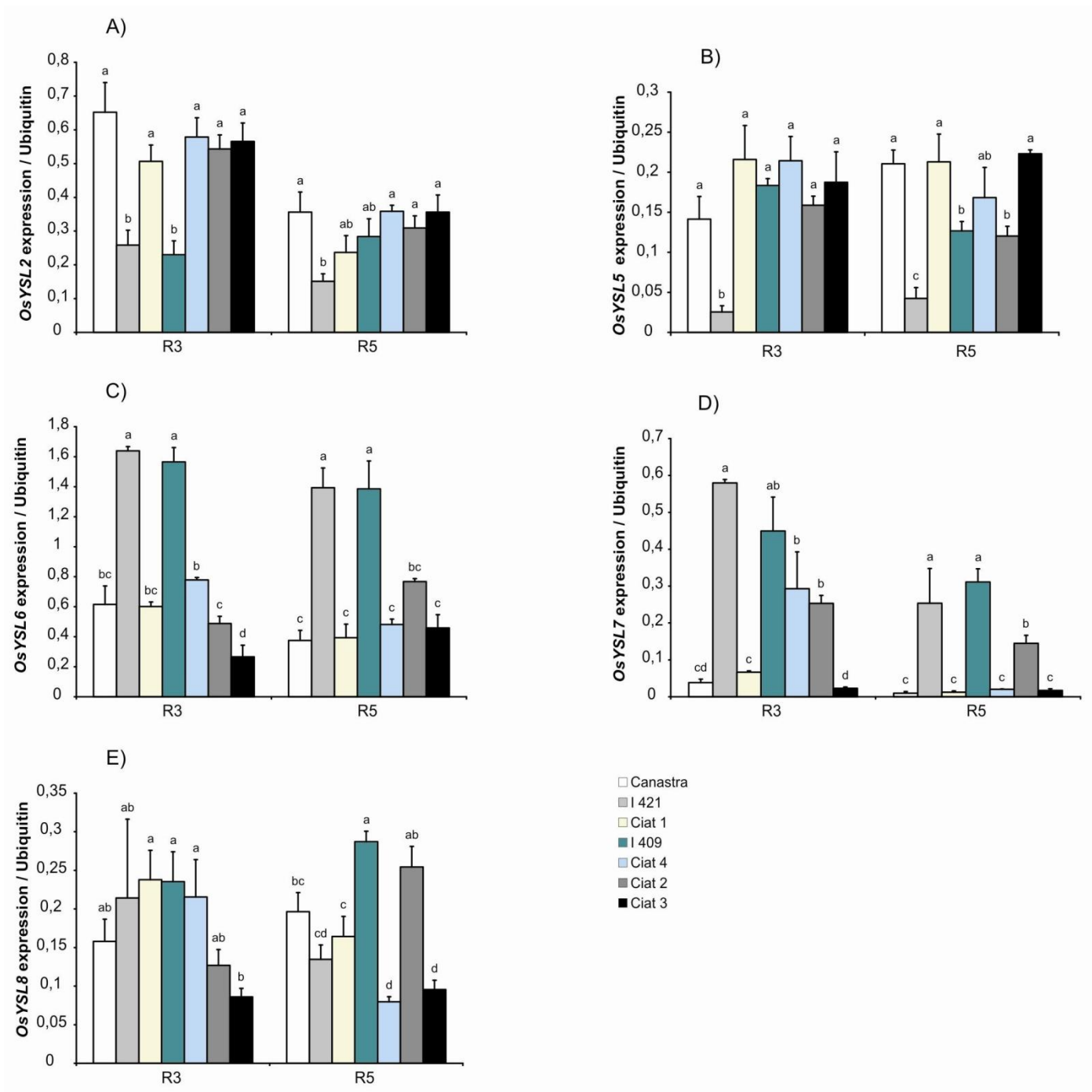


Figura 2. Análise da expressão de genes YSL em folhas bandeira de arroz em dois estádios de desenvolvimento reprodutivo (R3 e R5) por RT-PCR em tempo real. Expressão dos genes A) *OsYSL2*, B) *OsYSL5*, C) *OsYSL6*, D) *OsYSL7* e E) *OsYSL8*, relativa à expressão do gene de Ubiquitina. Os valores representam médias de três amostras \pm erro padrão. Letras minúsculas indicam o resultado do teste Duncan ($P \leq 0,05$).

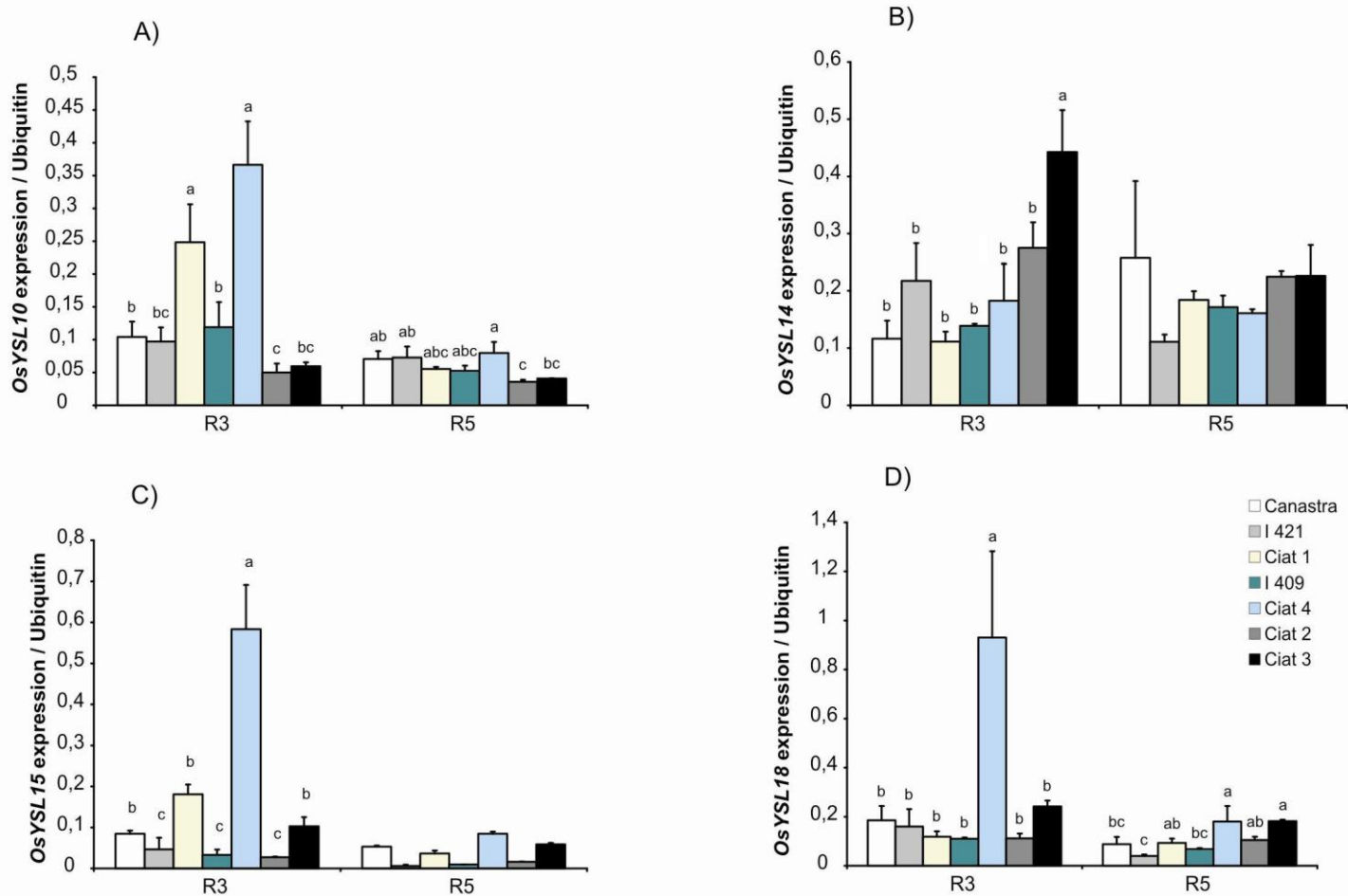


Figura 3. Análise da expressão de genes *YSL* em folhas bandeira de arroz em dois estádios de desenvolvimento reprodutivo (R3 e R5) por RT-PCR em tempo real. Expressão dos genes A) *OsYSL10*, B) *OsYSL14*, C) *OsYSL15* e D) *OsYSL18*, relativa à expressão do gene de Ubiquitina. Os valores representam médias de três amostras \pm erro padrão. Letras minúsculas indicam o resultado do teste Duncan ($P \leq 0,05$). Barras sem letras correspondem a conjuntos de dados que não atendem o critério de homogeneidade de variâncias, mesmo após transformação.

Tabela 2. Correlação de Pearson entre expressão de genes *YSL* em folhas bandeira nos estádios R3 e R5 com valores de concentração de ferro e zinco em grãos de arroz maduro.

Genes	Correlation to [Fe]		Correlation to [Zn]	
	R3	R5	R3	R5
<i>OsYSL2</i>	-0,12	-0,02	-0,07	-0,01
<i>OsYSL5</i>	0,54	0,15	0,25	0,02
<i>OsYSL6</i>	-0,39	-0,15	-0,48	-0,28
<i>OsYSL7</i>	-0,11	-0,11	-0,08	-0,28
<i>OsYSL8</i>	-0,33	-0,19	-0,52	-0,35
<i>OsYSL10</i>	0,12	-0,57	0,14	-0,22
<i>OsYSL14</i>	0,64	0,01	0,61	0,13
<i>OsYSL15</i>	0,28	0,22	0,46	0,44
<i>OsYSL18</i>	0,29	0,68	0,58	0,73

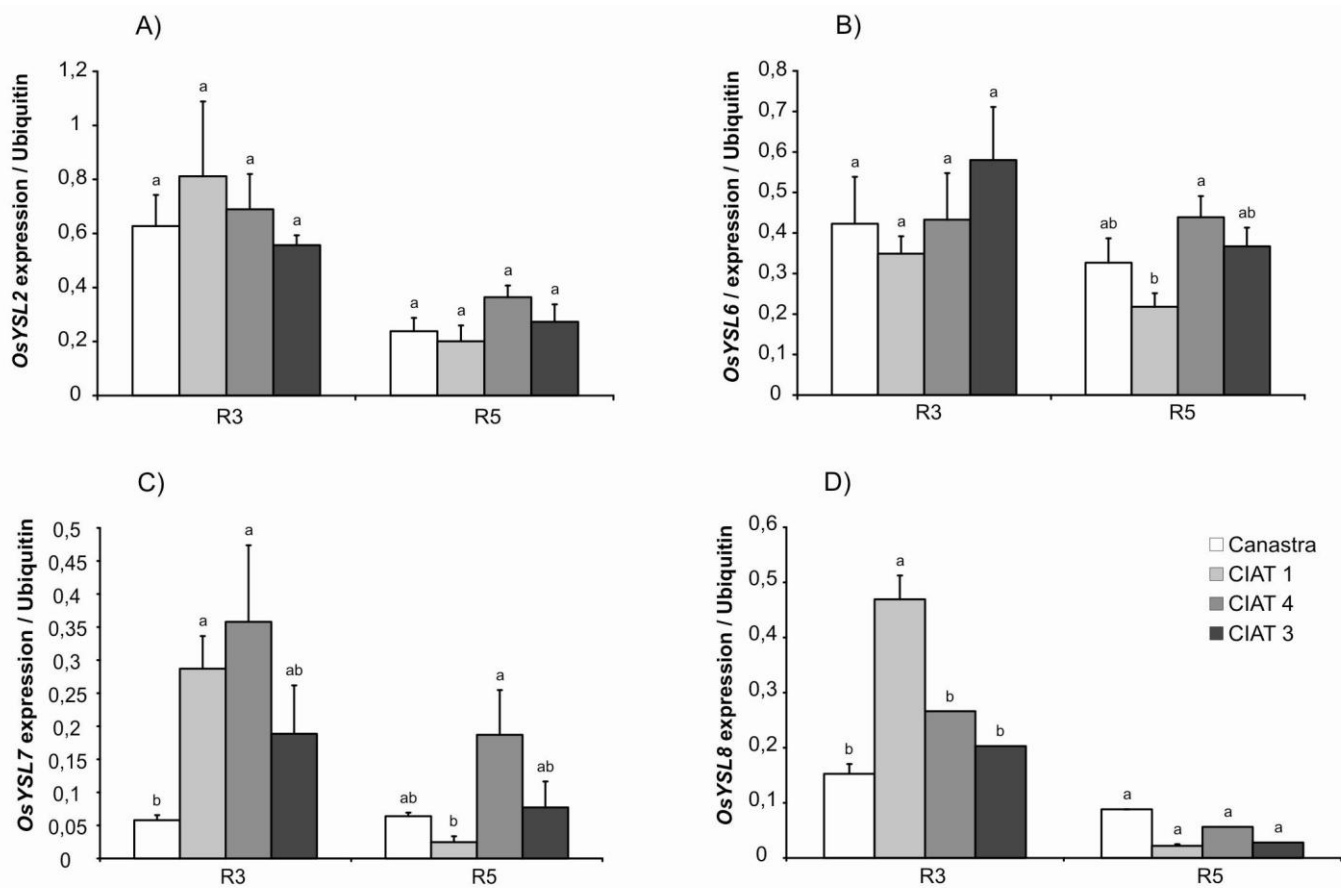


Figura 4. Análise da expressão de genes *YSL* em panículas de arroz em dois estádios de desenvolvimento reprodutivo (R3 e R5) por RT-PCR em tempo real. Expressão dos genes A) *OsYSL2*, B) *OsYSL6*, C) *OsYSL7* e D) *OsYSL8*, relativa à expressão do gene de Ubiquitina. Os valores são médias de três amostras \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferença ($p \leq 0.05$) pelo teste de Duncan.

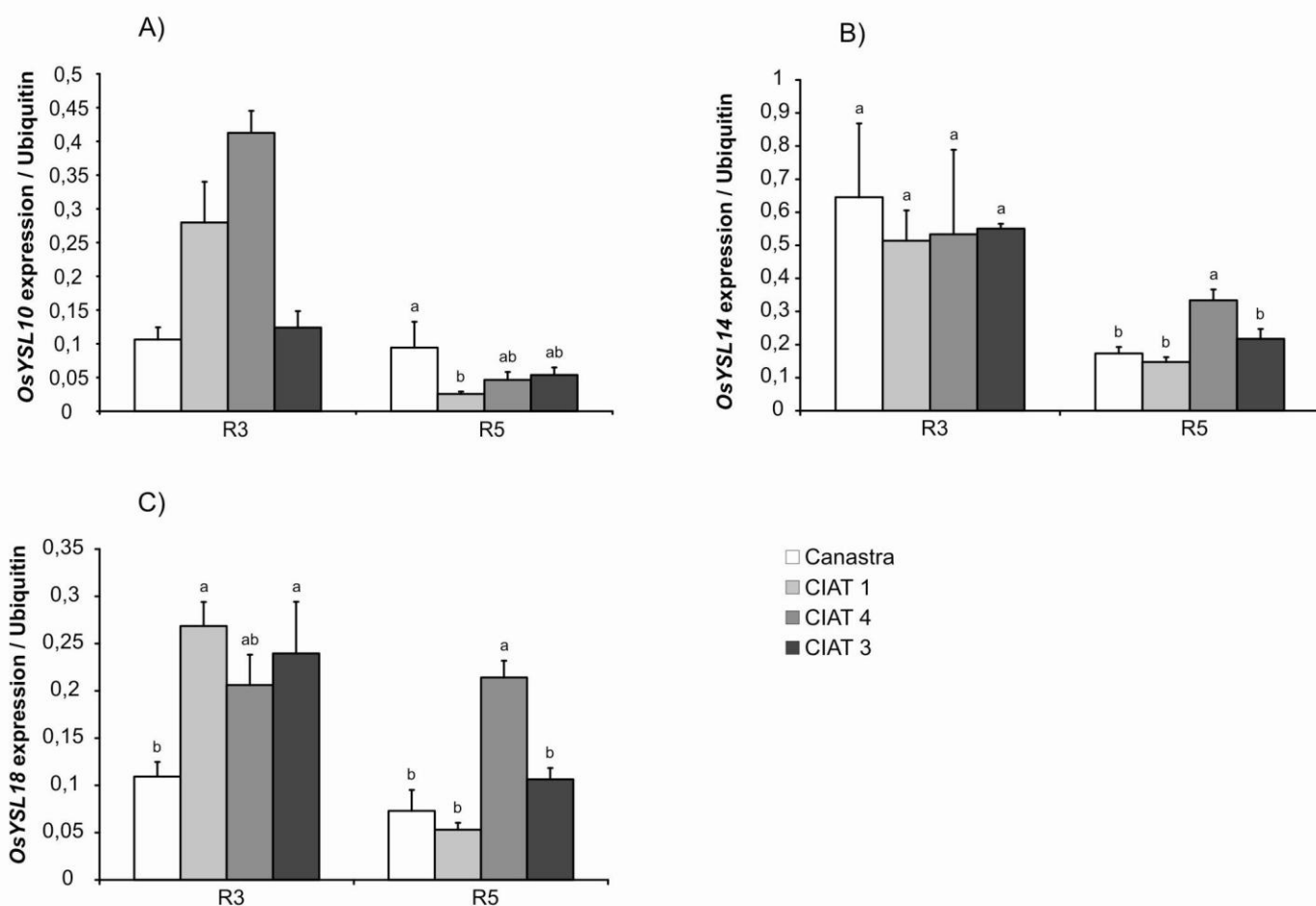


Figura 5. Análise da expressão de genes YSL em panículas de arroz em dois estádios de desenvolvimento reprodutivo (R3 e R5) por RT-PCR em tempo real. Expressão ubiquitina dos genes A) *OsYSL10*, B) *OsYSL14* e C) *OsYSL18*, relativa à expressão do gene de Ubiquitina. Os valores são médias de três amostras \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferença ($p \leq 0.05$) pelo teste de Duncan. Barras sem letras correspondem a um conjunto de dados que não atende o critério de homogeneidade de variâncias, mesmo após transformação.

Tabela 3. Correlação de Pearson entre expressão de genes *YSL* em panículas nos estádios R3 e R5 com valores de concentração de ferro e zinco em grãos de arroz maduro.

Genes	Correlation to [Fe]		Correlation [Zn]	
	R3	R5	R3	R5
YSL2	-0,11	0,47	-0,42	0,92
YSL6	0,51	0,36	0,58	0,89
YSL7	0,68	0,37	0,52	0,86
YSL8	0,23	-0,75	-0,31	-0,12
YSL10	0,39	-0,68	0,45	-0,17
YSL14	-0,80	0,50	-0,35	0,92
YSL18	0,78	0,48	0,20	0,90

Capítulo 3:

Identificação de novos genes envolvidos no transporte de ferro ao grão utilizando a técnica de SSH (*Suppression Subtraction Hybridization*)

Introdução

Nos últimos anos, muitas pesquisas vêm sendo realizadas focando a fisiologia e a regulação da aquisição de nutrientes. Os estudos com genes candidatos ou genes já identificados como participantes em alguma etapa da regulação da homeostase de ferro sem dúvida são muito importantes. Citando mais especificamente a relação do ferro com os vegetais, pouco se conhece sobre os mecanismos de transporte interno e armazenamento. Por este motivo não devemos limitar nossos estudos às famílias de genes “candidatos”, identificados com base em sua semelhança com genes de outras plantas, previamente caracterizados como tendo algum envolvimento na homeostase de ferro. Outros genes (outros transportadores, fatores de transcrição, etc.) certamente também são importantes para estes processos. Para isso, utilizamos a técnica de SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*), muito semelhante ao RDA, porém sem os sucessivos passos de hibridização e com um ponto de normalização entre as sequências de cDNA das duas populações comparadas.

O SSH é um aperfeiçoamento da técnica *Suppression PCR*, e permite a comparação entre duas populações de cDNA (Diatchenko et al, 1996). Muitos autores têm empregado esta técnica, que tem se mostrado bastante eficiente na identificação de novos genes relacionados a alguma determinada situação (Hou et al, 2005; Legrand et al, 2007; Merchan et al, 2007; Ouyang et al, 2007; Rizzo et al, 2007; Zinser et al, 2007).

O objetivo deste experimento foi identificar genes expressos em panículas de arroz durante o estágio de enchimento dos grãos (R5) que possam estar envolvidos com o transporte de nutrientes para o grão de arroz. Em outro trabalho realizado pelo nosso grupo, foram identificados genes com maior expressão em R5 do que em R3 em folhas bandeira. Optamos por utilizar panículas inteiras, sem dissecar os diferentes órgãos (pálea, lema e ráquila), na tentativa de identificar genes com expressão altamente induzida em algum deles na fase de enchimento do grão (R5). Assumimos

que um gene, cuja expressão fosse bastante elevada nesta fase em algum dos órgãos da panícula, poderia ser identificado, mesmo utilizando-se RNA de um “pool” de órgãos. Uma vez confirmada a expressão diferencial dos genes obtidos, etapas posteriores de avaliação detalhada em cada órgão poderiam ser realizadas.

Materiais e métodos

Material vegetal

Para construção da biblioteca, plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da cultivar IR75862 (subespécie japônica) proveniente do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) foram cultivadas em campo, na estação experimental do IRGA (Instituto Rio Grandense do Arroz) em Cachoeirinha (29° 54' 58.61"S 51° 10' 02.65"W) na safra 2006/07. Durante o desenvolvimento reprodutivo foram coletadas panículas nos estádios R3 (estádio *Reprodutivo 3* – fase de emborrachamento; a panícula ainda está envolta por uma bainha) e estágio R5 (estádio *Reprodutivo 5* – fase em que a panícula já emergiu e está ocorrendo o enchimento do grão), de acordo com a classificação de Counce et al (2000).

Para confirmação da biblioteca, plantas de arroz das cultivares IR75862, IR68144, Epagri 108 e Canastra (estas três últimas da subespécie índica) foram cultivadas em campo, na mesma estação experimental acima citada, na safra 2007/08. Durante o desenvolvimento reprodutivo foram coletadas panículas nos estádios R3 (estádio *Reprodutivo 3* – fase de emborrachamento; a panícula ainda está envolta por uma bainha), estágio R4 (estádio *Reprodutivo 4* – fase em que ocorre a fecundação da oosfera, em alguns períodos do dia é possível enxergar os estames), estágio R5 (estádio *Reprodutivo 5* – fase em que a panícula já emergiu e está ocorrendo o enchimento do grão) e estágio R7 (estádio *Reprodutivo 7* – o grão se encontra cheio e em fase de amadurecimento) (Counce et al, 2000). Os tecidos coletados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20°C. Cada tipo de tecido (cultivar/ estágio reprodutivo) foi representado por três amostras, sendo cada amostra composta por tecidos de três plantas diferentes.

Análise de elementos por ICP-OES

Sementes de nove plantas de cada uma das quatro cultivares foram coletadas e secas em estufa a 60°C por pelo menos 48 horas. As amostras secas foram preparadas de acordo com o método descrito por Narayanan et al (2007). As análises de elementos foram realizadas usando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*ICP-OES - inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy*) (CIROS ICP Model FCE12; Spectro, Kleve, Germany). Para verificar a precisão de calibração do equipamento, foram analisados padrões de folhas de tomate e farinha de arroz (SRM 1573A e 1568A, respectivamente; National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD) juntamente com as amostras de sementes de arroz. Estas análises foram realizadas no laboratório do Dr. Michael Grusak, USDA, Houston, USA.

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total dos tecidos foi extraído utilizando o kit Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen). Um micrograma de RNA total foi tratado com DNase I (Invitrogen), para evitar qualquer contaminação com DNA. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit SMART PCR cDNA Synthesis Kit by Clontech Laboratories (Palo Alto, CA, USA), seguindo instruções do fabricante. Para síntese da primeira fita de cDNA foi utilizada a transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen).

Construção da biblioteca subtrativa de cDNA

A biblioteca foi construída utilizando a técnica de *Supression Subtractive Hybridization* (SSH) seguindo o protocolo de Diatchenko et al (1996), utilizando o PCR- Select cDNA Subtraction Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA). A síntese da segunda fita de cDNA foi realizada utilizando 2 µl da primeira fita de cDNA. Os cDNAs resultantes, *tester* (R5) e *driver* (R3), foram digeridos com a enzima *Rsa I* e ligados aos adaptadores. Foram realizados dois ciclos de hibridização e amplificação por PCR

para enriquecer as sequências diferencialmente expressas. Foram utilizados 100 ng do cDNA subtraído para purificação e clonagem no vetor pCR2.1-TOPO Vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). Células competentes de *Escherichia coli*, linhagem XL1 Blue, foram transformadas com os produtos clonados. Os clones de bactérias foram isolados e crescidos em placas com 96 poços. A extração dos plasmídeos e o sequenciamento dos 96 clones selecionados foram realizados por MacroGen Inc., USA (<http://www.macrogen.com>). A sequência do vetor foi retirada manualmente e as sequências resultantes foram comparadas com sequências completas de cDNA de arroz utilizando o Rice Pipeline (<http://cdna.01.dna.affrc.go.jp/PIPE/>), que é uma ferramenta de unificação de dados provenientes vários bancos de informações (Yazaki et al, 2004).

Confirmação da biblioteca por RT-PCR em Tempo Real dos genes induzidos em panículas durante o estágio de enchimento do grão de arroz

RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR) foram conduzidas utilizando o equipamento Applied-Biosystem StepOne real-time PCR System. Os *primers* utilizados (tabela 1) foram projetados para amplificar fragmentos de 100 a 150pb da região 3' não traduzida (3'-UTR), com T_m igual a 60°C. As reações foram configuradas com 5 minutos de desnaturação, inicialmente a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 10 s a 94°C, 15 s a 60°C e 15 s a 72°C. Ao fim de cada reação foi realizada a curva de desnaturação (*melting curve*) na qual cada amostra era mantida a 40°C por 2 minutos, para hibridização das duplas fitas amplificadas, e aquecidas de 55°C a 99°C com aumento de temperatura de 0,1°C por segundo. Cada reação tinha volume final igual a 20 µl, na qual 10 µl eram de cDNA de cada amostra diluída 100 vezes, 2 µl de tampão PCR 10X, 1.2 µl de MgCl₂ 50 mM, 0.1 µl de dNTPs 10 mM, 0.4 µl do par de primers 10 µM, 4.25 µl de água, 2.0 µl de SYBR green (1:10.000 Invitrogen) e 0.05 µl de Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µl, Invitrogen). A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método de comparação do Ct (threshold cycle), utilizando os valores de eficiência de

amplificação de cada amostra para normalização dos dados (Livak and Schmittgen, 2001). Cada amostra foi analisada em triplicata e o valor de ΔC_T foi obtido pela subtração do valor de Ct do gene de interesse do valor de Ct obtido para a expressão do gene da Ubiquitina para a mesma amostra.

Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($P \leq 0.05$), usando-se o software SPSS Base 12.0 for Windows (SPSS Inc., USA).

Tabela 1. Sequência dos *primers* projetados para confirmação da biblioteca de hibridização subtrativa de panículas de arroz. Todos os *primers* foram projetados na região 3' - UTR com Tm igual a 60°C.

Gene	Forward primer 5' → 3'	Reverse primer 5' → 3'
Unknown protein	CTCCTGAAGGGACGTTGAAG	TGAACAGGTTAAGCCTCACG
<i>OsGLU</i>	ATCACATCGGCTACGGTCTT	GGAGGCGACTGAGAAGGTC
<i>OsLTP</i>	GCGTTCGTGCAGTTTAGTGT	CTCAGCATCCCTCCGAGATA
<i>OsSPL1</i>	CGGTGCTTTAGCATGAAACTG	AACCTGTAATCTGCCTCATTTG
<i>OsMYB</i>	TGGTTATCCCCATTCTCCT	TGAACCAGTCAACCAGACACA
<i>OsUBQ</i>	AACCAGCTGAGGCCCAAGA	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA

Resultados e discussão

Concentração de ferro e zinco em sementes

A análise da concentração de ferro e zinco foi realizada em sementes maduras (estádio R9, segundo Counce et al, 2000) das quatro cultivares utilizadas neste estudo, utilizando a técnica de ICP-OES. As cultivares IR68144 e IR75862 apresentaram concentrações significativamente maiores de ferro em grãos ($P \leq 0,05$), enquanto Canastra e Epagri 108 apresentaram concentrações baixas deste elemento (Figura 1A). Em relação à concentração de zinco nos grãos, a cultivar IR75862 apresentou as concentrações mais elevadas, as cultivares IR68144 e Canastra apresentaram concentrações intermediárias e a cultivar Epagri 108 a menor concentração (Figura 1B). Alguns autores já relataram a existência de correlação entre concentrações de ferro e zinco em grãos de trigo (Cakmak et al. 2004; Morgounov et al. 2007) e em arroz (Jiang et al. 2007). Distelfeld et al. (2007) demonstrou a existência de correlação entre concentração de proteínas, ferro, zinco e manganês em grãos de trigo. Em arroz, Sperotto et al (comunicação pessoal – trabalho a ser submetido em 2009) verificou a existência de correlação entre concentração de proteínas, ferro e zinco em grãos de arroz, sugerindo que concentrações mais elevadas de proteínas, ferro e zinco ocorram simultaneamente.

Uma vez que o estudo em questão visa identificar novos genes envolvidos no transporte de ferro aos grãos de arroz, optou-se por utilizar a cultivar IR75862 na construção da biblioteca subtrativa pela técnica de *SSH*, devido às suas características acima citadas.

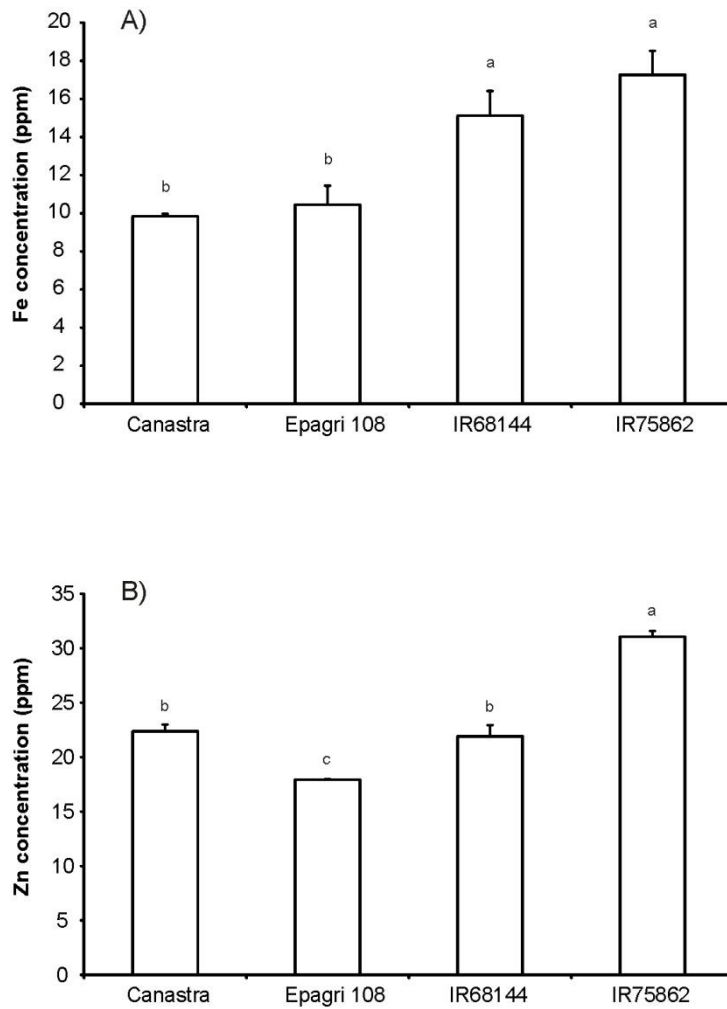


Figura 1. Concentrações de ferro (A) e zinco (B) em grãos maduros descascados das cultivares de arroz Canastra, Epagri 108, IR68144 e IR75862. As barras representam as médias de três repetições \pm o erro padrão. Letras diferentes indicam diferença ($p \leq 0.05$) pelo teste de Duncan.

Construção da biblioteca de hibridização subtrativa

O SSH se baseia na construção de uma biblioteca de genes diferencialmente expressos a partir da subtração entre cDNA *tester* (cDNA de panículas em R5) e cDNA *driver* (cDNA de panículas em R3), visando enriquecer somente as sequências presentes em maior concentração na população *tester*. Neste caso, o objetivo era identificar sequências com maior abundância durante o enchimento dos grãos, em R5. Os resultados gerados a partir da técnica de SSH nos permitiram identificar 12 genes com expressão induzida durante o estágio de enchimento dos grãos de arroz (R5), sendo apenas um com função desconhecida (Tabela 2). Os genes identificados participam dos mais variados processos celulares. Alguns foram escolhidos para confirmação da biblioteca, considerando-se a sua relação potencial com o processo de enchimento do grão. Os genes selecionados para confirmação da biblioteca foram: fator de transcrição *MYB*; fator de transcrição *SPL1*; uma proteína envolvida no transporte de lipídeos (*LTP*); uma glutelina (*GLU*); e uma proteína com função desconhecida (*Unknown protein*).

Confirmação da biblioteca de SSH

Proteínas da família LTP (*Lipid Transfer Protein*) são descritas como transportadores de muitos tipos de lipídeos (Kader, 1996). Entretanto, alguns estudos apontam as proteínas desta família como responsivas a vários tipos de estresse abiótico, como salinidade, seca, tratamento com ácido abscísico e baixa temperatura (Vignols et al, 1997; Arondel et al, 2000; Hong et al, 2001; Yubero-Serrano et al, 2003; Wu et al, 2004; Kim et al, 2006) e também a estresse biótico, como por exemplo exposição ao fungo *Magnaporthe grisea* (Garcia-Olmedo et al, 1996; Blilou et al, 2000; Kristensen et al, 2000; Guiderdoni et al, 2002; Park et al, 2002; Kim et al, 2006). Em *Arabidopsis thaliana* foi demonstrado o envolvimento de LTP em resposta de longa distância durante resposta sistêmica adquirida a patógenos (Maldonado et al, 2002). Em trigo,

proteínas LTP competem com elicítina por receptores envolvidos no controle de respostas de defesa vegetal na membrana plasmática, sugerindo uma possível função para LTP como mediador de sinais (Buhot et al, 2001; Blein et al, 2002). Em arroz existem pelo menos 17 genes LTP. Estes genes são divididos em 3 subfamílias, de acordo com a estrutura das proteínas (Vignols et al, 1994, 1997; Garcia-Garrido et al, 1998). Kim et al (2006) sugerem o envolvimento de LTPs no carregamento de matéria prima necessária a reconstrução de tecidos infectados com *Magnaporthe grisea*. Em nossa abordagem experimental identificamos *OsLTP* (Rice Pipeline clone 002-167-B02) com expressão induzida em panículas durante o estágio de enchimento de grãos. Entretanto, isso não foi confirmado, uma vez que os valores de expressão em R3 e R5 obtidos por qRT-PCR foram equivalentes (Figura 2A). Mesmo que este resultado não seja satisfatório, é visível a indução deste gene no estágio R7, quando as sementes já se encontram cheias e em fase de amadurecimento (Figura 2A).

Proteínas de armazenamento em grãos (*SSPs* – seed storage proteins) são agrupadas em classes de acordo com suas características físicas em relação a sua solubilidade: albuminas, prolaminas, globulinas e glutelinas (Osborn, 1924 apud Kawakatsu et al, 2008; Okita et al, 1989). Em arroz existem pelo menos 11 genes para glutelina (Katsube-Tanaka et al, 2004), sendo estas as principais SSPs, podendo representar até 80% do peso total de proteínas nos grãos (Kawakatsu et al, 2008). As glutelinas começam a ser produzidas de 4 a 6 dias depois da antese (R4) (Okita et al, 1989) e apresentam o máximo de expressão até 20 dias depois do florescimento, quando começam a diminuir gradativamente os níveis de expressão durante o enchimento dos grãos (Suzuki et al, 1997). O gene *OsGLU* identificado em nossa biblioteca foi um dos dois com expressão diferencial confirmada entre os estágios de desenvolvimento dos grãos R3 e R5. Na cultivar IR75862, utilizada na construção da biblioteca, o gene tem sua expressão gradativamente induzida ao longo do desenvolvimento dos grãos (Figura 2D). Entretanto, quando avaliado em diferentes cultivares com teores contrastantes de ferro em grãos, não foi possível traçar um

paralelo entre as características nutritivas dos grãos e os níveis de expressão deste gene: a sua expressão não é maior nas cultivares com maiores concentrações de ferro, zinco e proteína no grão, IR68144 e IR75862 (Figura 3B).

Fatores de transcrição são extremamente importantes na regulação de rotas metabólicas. A expressão temporal e espacial de fatores de transcrição pode determinar mudanças na identidade celular ou até mesmo de alguns tecidos. Em geral, fatores de transcrição apresentam pelo menos dois domínios, um de ligação a DNA e um de ativação/ repressão, que operam juntos para regular processos fisiológicos e bioquímicos pela regulação de outros genes (Ptshane, 1988 apud Yanhui et al, 2006). Em nossa biblioteca identificamos dois genes que codificam fatores de transcrição: *OsSPL1* e *OsMYB*.

Em arroz existem pelo menos 19 genes SPL (Squamosa promoter-binding like) (Xie et al, 2006). Em dicotiledôneas, foi sugerido o envolvimento destes genes com o desenvolvimento de inflorescências (Klein et al, 1996; Cardon et al, 1997, 1999; Unte et al, 2003). Em arroz, 11 genes SPL apresentam sequência complementar ao microRNA (miRNA) *OsmiR156*, o que sugere que alguns genes SPL são regulados pelo mecanismo de silenciamento induzido por RNA (Xie et al, 2006). Entretanto, o gene *OsSPL1*, identificado em nossa biblioteca, não possui esta sequência complementar ao *OsmiR156* (Xie et al, 2006). Em *Arabidopsis thaliana*, Yamazaki et al (2009) demonstraram o envolvimento do gene *AtSPL7* na ativação de diversos genes responsáveis pela homeostase de cobre, incluindo um micro RNA (*AtmiR398*), transportadores de cobre e uma chaperona de cobre (*CCH Copper Chaperone*).

Fatores de transcrição da família MYB apresentam um domínio de ligação a DNA altamente conservado (domínio MYB) formado por um a quatro motivos alfa hélice – volta – alfa hélice em tandem, denominados R0R1R2R3 (Jiang et al, 2004). Essa é uma das maiores famílias de fatores de transcrição em plantas, entretanto pouco se conhece sobre as funções específicas de seus membros. Alguns trabalhos sugerem a relação entre fatores de transcrição MYB e a expressão específica de genes, como por

exemplo o gene que codifica glutelina expressa em endosperma de arroz. A glutelina apresenta algumas sequências conservadas em seu promotor, são os motivos AACA, GCN4 e GCAA que são necessários para a expressão de glutelina especificamente em grãos (Zheng et al, 1993; Zhao et al, 1994; Takaiwa et al, 1996; Yoshihara and Takaiwa, 1996; Yoshihara et al, 1996). A sequência de nucleotídeos do motivo AACA é muito similar à sequência do elemento responsivo a giberelina (*GARE – gibberellic acid responsive element*). Em cevada foi demonstrada a capacidade de ligação específica de genes MYB ao GARE, regulando a expressão de alfa-amilase durante a germinação de sementes (Gubler et al, 1995).

Os dois fatores de transcrição identificados em nossa biblioteca, *OsSPL1* e *OsMYB* não tiveram seus padrões de expressão confirmados (Figura 2B e C). Contrariando o resultado obtido pela biblioteca, ambos genes apresentaram os menores níveis de expressão no estágio R5. Não é possível fazer qualquer relação entre *OsMYB* e *OsGLU* identificados neste estudo, uma vez que os níveis de expressão observados não apresentam relação de regulação positiva tampouco negativa.

A sequência mais interessante obtida com a construção da biblioteca é uma proteína com função desconhecida (Rice Pipeline clone 002-127-B06). Além de ter confirmado a biblioteca (Figura 2E), apresentou os maiores níveis de expressão, chegando próximo aos valores observados para ubiquitina (gene constitutivo utilizado como referência) dependendo da cultivar e do estágio de desenvolvimento (Figura 3A). No estágio R3 este gene é muito pouco expresso apresentando uma diferença muito grande para os estágios subseqüentes em todas as cultivares, o que pode estar relacionado com o desenvolvimento/ enchimento dos grãos de arroz.

Embora apenas dois genes tenham confirmado a biblioteca gerada por *SSH*, o gene *OsGLU* serviu como controle da qualidade da biblioteca e das confirmações, uma vez que já se conhece o padrão de expressão deste gene durante o desenvolvimento dos grãos de arroz. Entretanto, o objetivo principal era identificar novos genes potencialmente envolvidos no transporte de nutrientes, principalmente ferro, para os

grãos em desenvolvimento. A proteína desconhecida identificada apresenta um padrão de expressão bastante particular, podendo estar envolvida em alguma etapa da nutrição dos grãos. Entretanto, estudos mais detalhados devem ser realizados para investigar as possíveis funções desta proteína, incluindo esta possibilidade.

Em relação aos genes que foram utilizados na confirmação da biblioteca mas apresentaram resultados contrastantes nas análises por q-PCR (*OsLTP*, *OsSPL1* e *OsMYB*), pode-se atribuir os resultados ao fato de que as plantas utilizadas na construção da biblioteca e as utilizadas nas confirmações foram cultivadas em safras diferentes (2006/07 e 2007/08, respectivamente), sendo expostas às variações climáticas de cada ano. Também é possível que a intensidade de indução de alguns genes tenha sido diferente de um ano para outro. Como foi utilizado um “pool” de órgãos da panícula, uma indução menos drástica de um gene pode ter sido mascarada pelos RNAs dos demais órgãos.

Tabela 2. Genes com expressão induzida em panículas de arroz durante a fase de enchimento dos grãos (R5). Em destaque os genes escolhidos para confirmação da biblioteca gerada por SSH.

Rice Pipeline clone nº	E-value	Descrição	Redundância
J013025E02	1e-103	Mitochondrial processing peptidase beta subunit	1
001-205-F05	4e-78	IAA-aminoacid hydrolase	3
J013025E02	1e-103	Mitochondrial processing peptidase beta subunit	3
J075133L10	7e-20	SPL1-related protein (Squamosa promoter-binding-like)	1
J013001C24	8e-41	Rubisco activase	1
002-127-B06	1e-126	Unknown protein	5
002-167-B02	2e-63	Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein	9
J075184M03	1e-132	Glutelin type-B (seed storage protein)	1
J033145G16	1e-39	CCR4-NOT-associated factor, subunit 7	3
J090034J17	0.0	DNA-directed RNA polymerase beta chain	7
J023108E10	0.0	MYB transcription factor (BR1-KD-interacting protein)	2
J090019C07	2e-87	NADPH-plastoquinone oxireductase subunit K	1

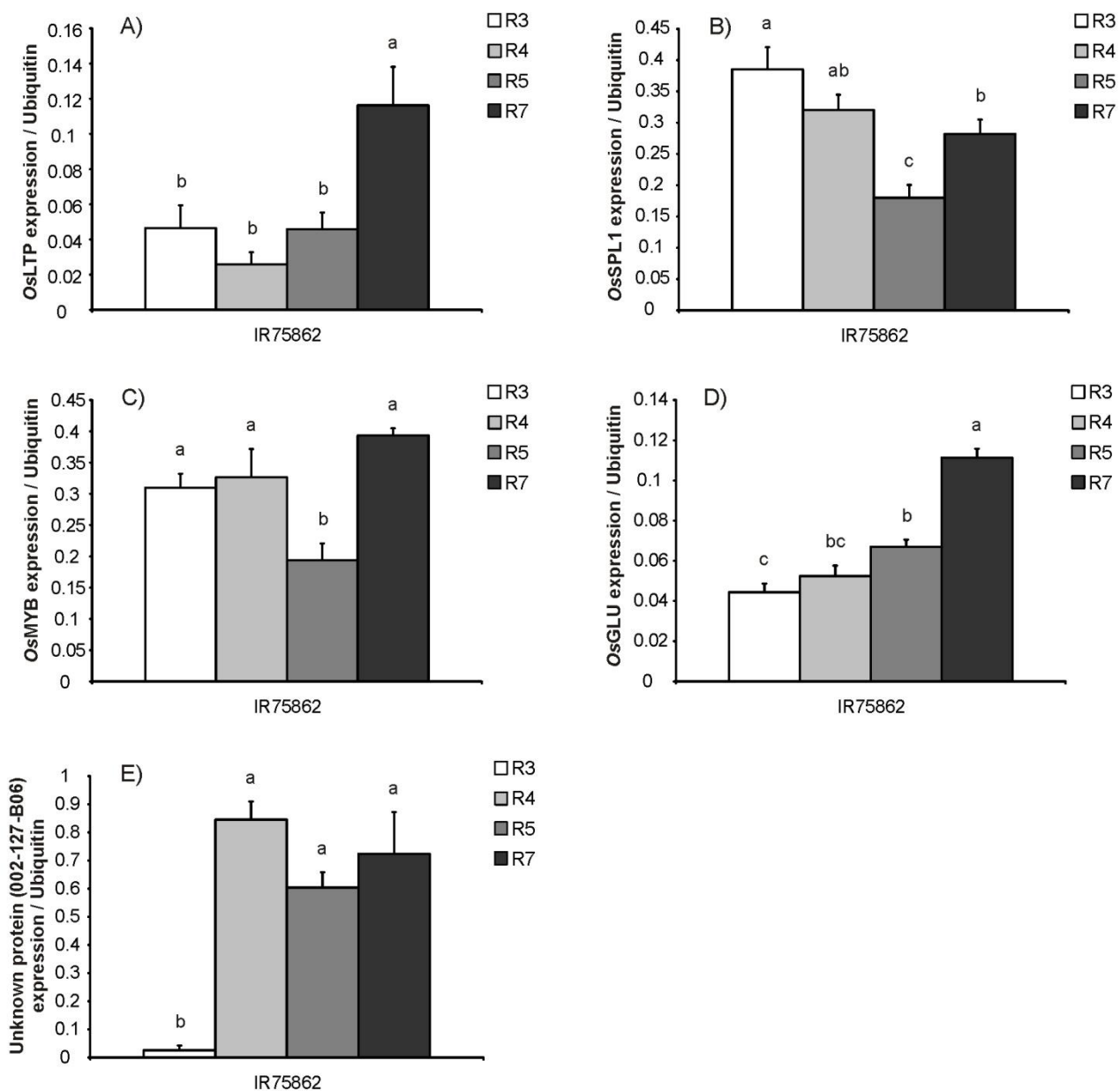


Figura 2. Expressão relativa (qRT-PCR) em panículas das cultivares IR75862 nos estádios de desenvolvimento R3, R4, R5 e R7. A) *OsLTP*; B) *OsSPL1*; C) *OsMYB*; D) *OsGLU*; E) Proteína desconhecida. Expressão relativa a ubiquitina. Os valores representam médias de três amostras. Barras indicam erro padrão. Letras minúsculas indicam o resultado do teste Duncan ($P \leq 0,05$).

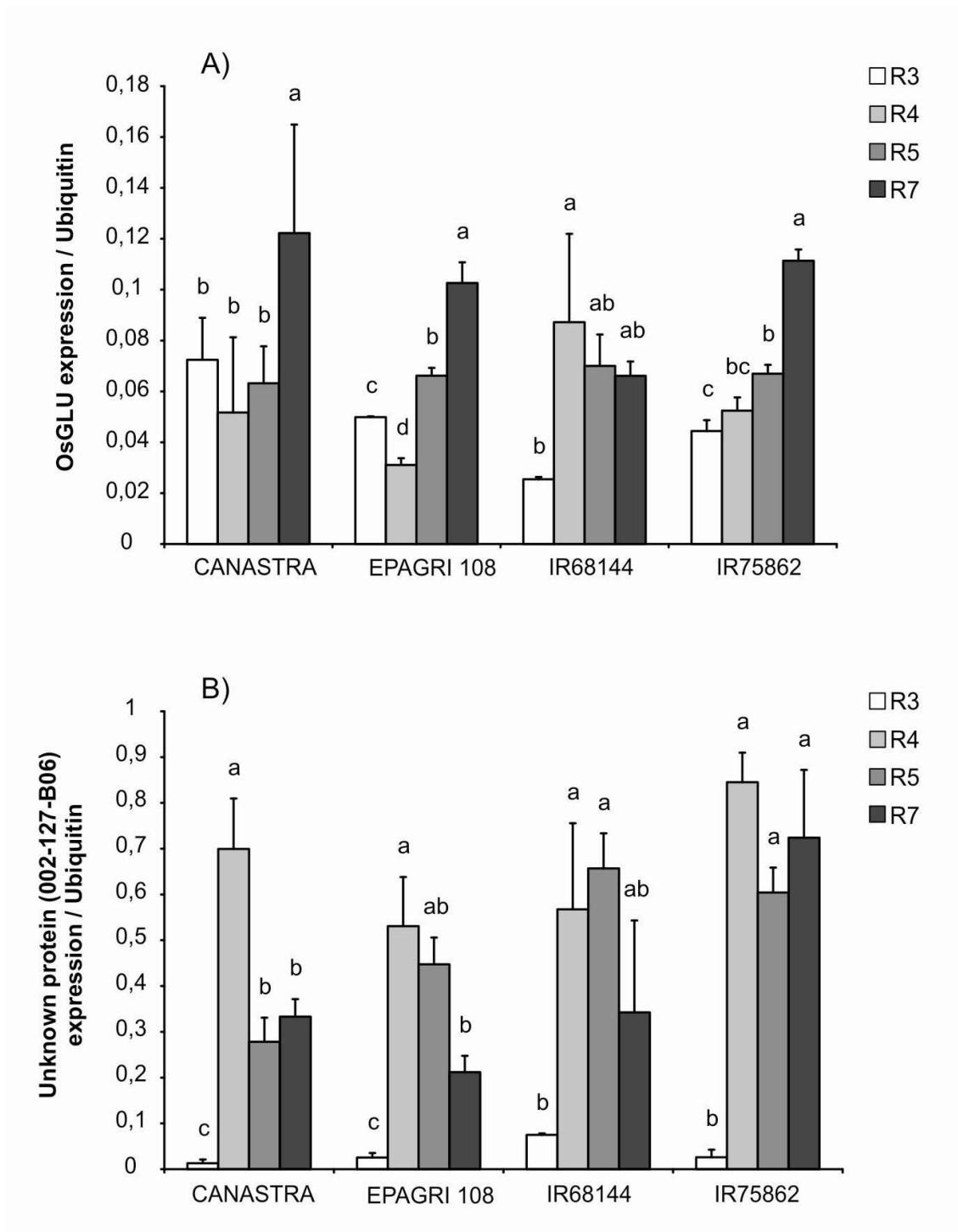


Figura 3. Expressão relativa (qRT-PCR) em panículas das cultivares Canastra, Epagri 108, IR86144 e IR75862 nos estádios de desenvolvimento R3, R4, R5 e R7. A) *OsGLU*; B) Proteína desconhecida. Expressão relativa a ubiquitina. Os valores representam médias de três amostras. Barras indicam erro padrão. Letras minúsculas indicam o resultado do teste Duncan ($P \leq 0,05$).

Considerações finais

Os mecanismos que envolvem a aquisição de ferro, distribuição e armazenamento nas plantas ainda não foram totalmente desvendados. O estudo de genes candidatos é uma boa fonte de informações sobre alguns aspectos da homeostase de metais. Genes *YSL*, candidatos a transportar ferro ligado a nicotianamina ou derivados de ácido mugineico, são capazes de desempenhar funções em diversas partes das plantas de arroz, desde a aquisição de ferro pelas raízes até o enchimento de grãos nas panículas.

O gene *OsYSL15* apresenta um padrão de expressão elevado em raízes de plantas submetidas à deficiência de ferro, o que sugere que este seja um transportador de ferro de alta afinidade. Entretanto, em condições normais, verificamos que plantas mutantes para este gene apresentam desenvolvimento normal e produzem sementes com concentrações maiores de ferro e zinco. Uma hipótese é que a falta da expressão basal de *OsYSL15* em condições normais sirva como estímulo para a planta ativar outras rotas de aquisição de ferro. A atividade destes genes pode resultar em aumento do transporte inespecífico de zinco.

As análises de expressão de genes *YSL* em folhas bandeira e panículas de plantas de arroz sugerem a importância de alguns destes genes na fase de produção e enchimento dos grãos. O gene que parece mais interessante nestas condições é o *OsYSL18*, que pode estar envolvido com carregamento de metais no floema de folhas bandeira, para serem transportados até os grãos em desenvolvimento. No entanto, as análises de correlação apresentadas nesta Dissertação devem ser consideradas como dados preliminares, visto que ainda deverão ser submetidas à análise estatística mais refinada, para determinação do grau de significância de cada um dos coeficientes de correlação apresentados no capítulo 2. Os dados de expressão de genes *YSL* apresentados nesta Dissertação serão somados a dados de expressão de outros vinte

genes (todos potencialmente envolvidos com homeostase de ferro e/ ou zinco) em uma única publicação, atualmente em fase de redação.

Estudos envolvendo genes candidatos colaboram com o entendimento dos processos necessários à homeostase de metais em plantas. Entretanto, genes ainda desconhecidos também podem estar envolvidos. A construção da biblioteca de hibridização subtrativa com panículas em dois estádios de desenvolvimento possibilitou identificar uma sequência muito promissora. Este gene com função ainda desconhecida é muito pouco expresso no estágio R3 de todas as cultivares testadas, mas é altamente induzido em panículas em desenvolvimento a partir do estágio R4 (antese, segundo Counce et al, 2000), podendo estar participando ativamente no processo de enchimento dos grãos ou ainda no transporte de metais para os mesmos. Análises mais detalhadas deste gene estão sendo realizadas na tentativa de identificar sua provável função.

Referências bibliográficas

Arondel V, Vergnolle C, Cantrel C, Kader J-C (2000) Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 159: 1-12.

Becana M, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I (1998) Iron dependent oxygen free radical generation in plants subjected in environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil* 201: 137-147.

Beinfait HF (1989) Prevention of stress in iron metabolism of plants. *Acta Botanica Neerl.*, v. 38(2), p. 105-129.

Blein JP, Coutos-Thevenot P, Marion D, Ponchet M (2002) From elicitors to lipid-transfer proteins: A new insight in cell signaling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci* 7: 293-296.

Blilou I, Ocampo JA, Garcia-Carrido JM (2000) Induction of *Ltp* (lipid transfer protein) and *Pal* (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *J Exp Bot* 51: 1969-1977.

Briat, JF, Curie C, Gaymard, F (2007) Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 276-282.

Briat JF, Lobréaux S (1998) Iron storage and ferritin in plants. Organizado por SIGEL, A., SIGEL, H. *Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals*. Marcel Dekker, New York, V. 35, p. 563-584.

Buhot N, Douliez JP, Jacquemard A, Marion D, Tran V, Maume BF, Milat ML, Ponchet M, Mikes V, Kader JC, Blein JP (2001) A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS Lett* 509: 27-30.

Burr B et al (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436: 793-800.

Cakmak I, Torun A, Millet E, Feldman M, Fahima T, Korol AB, Nevo E, Braun HJ, Ozkan H (2004) *Triticum dicoccoides*: an important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat. *Soil Sci Plant Nutr* 50: 1047-1054.

Cardon G, Hohmann S, Klein J, Nettlesheim K, Saedler H, Huijser P (1999) Molecular characterization of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* 237: 91-104.

Cardon GH, Hohmann S, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P (1997) Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene SPL3: a novel gene involved in the floral transition. *Plant J* 12: 367-377.

Counce PA, Keisling TC, Mitchell AJ (2000) A uniform, objective and adaptative system for expressing rice development. *Crop Sci* 40: 436-443.

Curie C, Alonso JM, Le Jean M, Ecker JR, Briat J-F (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochemical Journal*, v. 347, p. 749-755.

Curie C & Briat JF (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54: 183-206.

Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL (2001) Maize *yellow stripe1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*, v. 409, p. 346-349.

Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6025–6030.

DiDonato RJ Jr, Roberts LA, Sanderson T, Eisley RB, Walker EL (2004) *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine- metal complexes. *Plant J*.39(3):403-14.

Distelfeld A, Cakmak I, Peleg Z, Ozturk L, Yazici AM, Budak H, Saranga Y, Fahima T (2007) Multiple QTL-effects of wheat *Gpc-B1* locus on grain protein and micronutrient concentrations. *Physiol Plant* 129: 635-643.

Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 5624-5628.

Fox TC, Guerinot ML (1998) Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* v. 49, p. 669-96.

Gale MD, Devos KM (1998) Comparative genetics in the grasses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(5):1971-4.

- Garda-Garrido JM, Menossi M, Puigdomenech P, Martinez- Izquierdo JA, Delseny M (1998) Characterization of a gene encoding an abscisic acid-inducible type-2 lipid transfer protein from rice. *FEBS Lett* 428: 193-199.
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M (1995) The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol* 3: 72-74.
- Gendre D, Czernic P, Conejero G, Pianelli K, Briat JF, Lebrun M and Mar S (2007) TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/ Fe transporter. *PlantJ.*49,115.
- Gross J; Stein R J, Fett-Neto AG, Fett JP (2003) Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology*, v. 26, p. 477-497.
- Grotz N, Guerinot ML (2002) Limiting nutrients: an old problem with new solutions? *Curr Opin Plant Biol.* 5(2):158-63.
- Grusak MA, DellaPenna D, Welch RM(1999) Physiologic processes affecting the content and distribution of phytonutrients in plants. *Nutr Rev.* 57(9 Pt 2):S27-33.
- Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen JV (1995) Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell.*; 7(11): 1879-91.
- Guerinot ML, Yi Y (1994). Iron: nutritious, noxious, not readily available. *Plant Physiology*, v. 104, p.815-820.
- Guideroni E, Cordero MJ, Vignols F, Garcia-Garrido JM, Lescot M, Tharreau D, Meynard D, Ferriere N, Notteghem JL, Delseny M (2002) Inducibility by pathogen attack and developmental regulation of the rice *Ltp1* gene. *Plant Mol Biol* 49: 683-699.
- Gura T (1999) New genes boost rice nutrients. *Science* vol. 285, p. 994-995.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* 1992 Jul 27;307(1):108-12.
- Hirochika H, Guideroni E, An G, Hsing YI, Eun MY, Han CD, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, Pereira A, Sundaresan V, Leung H. Rice mutant resources for gene discovery (2004) *Plant Mol Biol.* 54(3):325-34.

Hodoshima H, Enomoto Y, Shoji K, Shimada H, Goto F and Yoshihara T (2007) Differential regulation of cadmium-inducible expression of iron-deficiency-responsive genes in tobacco and barley. *Physiol. Plantarum* 129, 622-634.

Hong ST, Lee MY, Kim SR (2001) Molecular cloning of the anther-preferential nonspecific lipid transfer protein cDNA in hot pepper by mRNA differential display. *Mol Cells* 11: 241-249.

Hou XL, Wu P, Jiao JC, et al (2005) Regulation of the expression of OsIPS1 and OsIPS2 in rice via systemic and local Pi signalling and hormones. *Plant Cell and Environment*, v.28(3): 353-364.

Hubank M, Schatz DG (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res.* 22(25):5640-8.

Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, Takahashi M, Kakei Y, Suzuki K, Nakazono M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2009) Rice OsYSL15 Is an Iron-regulated Iron(III)-Deoxymugineic Acid Transporter Expressed in the Roots and Is Essential for Iron Uptake in Early Growth of the Seedlings. *J. Biol. Chem.* 284: 3470 - 3479.

Jiang C, Gu X, Peterson T (2004) Identification of conserved gene structures and carboxy-terminal motifs in the Myb gene family of *Arabidopsis* and *Oryza sativa* L. ssp. *indica*. *Genome Biol.* 5(7):R46.

Jiang SL, Wu JG, Feng Y, Yang XE, Shi CH (2007) Correlation analysis of mineral element contents and quality traits in milled rice (*Oryza sativa* L.). *J Agric Food Chem* 55: 9608-9613.

Kader JC (1996) Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47:627-654.

Katsube-Tanaka T, Duldulao JBA, Kimura Y, Iida S, Yamaguchi T, Nakano J, Utsumi S (2004) The two subfamilies of rice glutelin differ in both primary and higher-order structures. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1699:95–102.

Kawakatsu T, Yamamoto MP, Hirose S, Yano M, Takaiwa F (2008) Characterization of a new rice glutelin gene GluD-1 expressed in the starchy endosperm. *J Exp Bot*;59(15):4233-45.

Kim TH, Kim MC, Park JH, Han SS, Kim BR, Moon BY, SuhMC, Cho SH (2006) Differential Expression of Rice Lipid Transfer Protein Gene (*LTP*) Classes in Response to Abscisic Acid, Salt, Salicylic Acid, and the Fungal Pathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Plant Biology*, 49(5): 371-375.

Klein J, Saedler H, Huijser P(1996) A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA. *MolGenGenet* 250: 7-16.

Koike S, Inoue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J.* 39(3):415-24.

Kristensen AK, BrunstedtJ, Nielsen KK, Roepstorff P, Mikkelsen JD(2000) Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. *Plant Sci* 155: 31-40.

Le Jean M, Schikora A, Mari S, Briat JF, Curie C (2005) A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *Plant J.* 44(5):769-82.

Legrand S, Hendriks T, Hilbert JL, et al (2007) Characterization of expressed sequence tags obtained by SSH during somatic embryogenesis in *Cichorium intybus* L. *BMC Plant Biology*, v. 727.

Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M (1993)Cloning the differences between two complex genomes. *Science.* 259(5097):946-51.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25: 402-408.

Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 399-403.

Marschner, H. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants, Second Edition, Academic Press, London, 889 p.

Meng F, Wei Y, Yang X (2005) Iron content and bioavailability in rice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 333-338.

Merchan F, De Lorenzo L, Rizzo SG, et al (2007) Identification of regulatory pathways involved in the reacquisition of root growth after salt stress in *Medicago truncatula*. *Plant Journal*, v.51 (1): 1-17.

Morgounov A, Gómez-Becerra HF, Abugalieva A, Dzhunusova M, Yessimbekova M, Muminjanov H, Zelenskiy Y, Ozturk L, Cakmak I (2007) Iron and zinc grain density in common wheat grown in Central Asia. *Euphytica* 155: 193-203.

Mori S, Nishizawa N, Hayashi H, Chino M, Yoshimura E, Ishihara J (1991) Why are young rice plants highly susceptible to iron deficiency? *Plant and Soil* 130: 143-156.

Murata Y, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K, Iwashita T (2006) A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *Plant J.* 46(4):563-72.

Narayanan NN, Vasconcelos MW, Grusak MA (2007) Expression profiling of *Oryza sativa* metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray. *Plant Physiol Biochem* 45: 277-286.

Okita TW, Hwang YS, Hnilo J, Kim WT, Aryan AP, Larson R, Krishnan HB (1989) Structure and expression of the rice glutelin multigene family. *Journal of Biological Chemistry* 264:12573–12581.

Osborn T (1924) *The vegetable proteins*. London, FL: Longmans, Green and Co.

Ostergaard L, Yanofsky MF (2004) Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 39(5):682-96.

Ouyang b, Yang T, Li HX et al(2007) Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis. *Journal of Experimental Botany*, v.58 (3): 507-520.

Park CJ, Shin R, Park JM, Lee GJ, You JS, Paek KH (2002) Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol Biol* 48: 243-254.

Pastorian K, Hawel L 3rd, Byus CV (2000) Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal Biochem.* 15;283(1):89-98.

Ptashne M (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335: 683-689.

Robinson N, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, v. 397, p. 694-697.

Rizzo M, Bernardi R, Salvini M, et al (2007) Identification of differentially expressed genes induced by ozone stress in sensitive and tolerant poplar hybrids. *Journal of Plant Physiology*, v.164 (7): 945-949.

Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu BE, Mori S, Kitahara T, Wren NV (2004) ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytochelator and nicotianamine-chelated metals, *J. Biol.Chem.* 279, p. 9091- 9096.

Suzuki A, Suzuki T, Tanabe F, Toki S, Washida H, Wu CY, Takaiwa F (1997) Cloning and expression of five myb-related genes from rice seed. *Gene* Oct 1;198(1-2):393-8.

Suzuki A, Wu C-Y, Washida H, Takaiwa F (1998) Rice MYB Protein OSMYB5 Specifically Binds to the AACAA Motif Conserved among Promoters of Genes for Storage Protein Glutelin. *Plant and Cell Physiology*, Vol. 39, No. 5 555-559

Takaiwa F, Yamanouchi U, Yoshihara T, Washida H, Tanabe F, Kato A, Yamada K (1996) Characterization of common cis-regulatory elements responsible for the endosperm-specific expression of members of the rice glutelin multigene family. *Plant Mol Biol.*; 30(6): 1207-21.

Takahashi M, Nakanishi H, Kawasaki S, Nishizawa KK, Mori S (2001) Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature Biotech* 19: 466-469.

Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 4991-4996.

Unte US, Sorensen AM, Pesaresi P, Gandikota M, Leister D, Saedler H, Huijser P (2003) SPL8, an SBP-box gene that affects pollen sac development in *Arabidopsis*. *PlantCell* 15: 1009-1019.

Vignols F, Lund G, Pammi S, Tremousaygue D, Grellet F, Kader JC, Puigdomenech P, Delseny M (1994) Characterization of a rice gene coding for a lipid transfer protein. *Gene* 142: 265-270.

Vignols F, Wigger M, Garcia-Garrido JM, Grellet F, Kader JC, Delseny M (1997) Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated. *Gene* 195: 177-186.

Waters BM, Chu HH, Didonato RJ, Roberts LA, Easley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL (2006) Mutations in *Arabidopsis* yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol.* 141(4):1446-58.

Wu G, Robertson AJ, Liu X, Zheng P, Wilen RW, Nesbitt NT, Gusta LV (2004) A lipid transfer protein gene BG-74 is differentially regulated by abiotic stress, ABA, anisomycin, and sphingosine in bromegrass (*Bromus inermis*). *J Plant Physiol* 161: 449-458.

Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T (2009) SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Advance Online Publication*.

Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, Zhaofeng G, Zhiqiang L, Yunfei Z, Xiaoxiao W, Xiaoming Q, Yunping S, Li Z, Xiaohui D, Jingchu L, Xing-Wang D, Zhangliang C, Hongya G, Li-Jia Q (2006) The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol.*: 60 (1): 107-24.

Yazaki N, Kojima K, Suzuki K, Kishimoto N, Kikuchi S (2004) The Rice PIPELINE: a unification tool for plant functional genomics. *Nucl Acids Res* 32: 383–387.

Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (1976) *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Yoshihara T, Takaiwa F (1996) cis-regulatory elements responsible for quantitative regulation of the rice seed storage protein glutelin GluA-3 gene. *Plant Cell Physiol.*; 37(1): 107-11.

Yoshihara T, Washida H, Takaiwa F (1996) A 45-bp proximal region containing AACA and GCN4 motif is sufficient to confer endosperm-specific expression of the rice storage protein glutelin gene, GluA-3. *FEBS Lett.*; 383(3): 213-8.

Yubero-Serrano EM, Moyano E, Medina-Escobar N, Munoz-Blanco J, Caballero JL (2003) Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *J Exp Bot* 54: 1865-1877.

Xie K, Wu C, Xiong L (2006) Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiol.* 2006 Sep;142(1):280-93.

Zhao H, Eide D (1996 A) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(6):2454-8.

Zhao H, Eide D (1996 B) The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*271(38):23203-10.

Zhao Y, Leisy DJ, Okita TW (1994) Tissue-specific expression and temporal regulation of the rice glutelin Gt3 gene are conferred by at least two spatially separated cis-regulatory elements. *Plant Mol Biol.*;25(3):429-36.

Zheng Z, Kawagoe Y, Xiao S, Li Z, Okita T, Hau TL, Lin A, Murai N (1993) 5' distal and proximal cis-acting regulator elements are required for developmental control of a rice seed storage protein glutelin gene. *Plant J.*; 4(2): 357-66.

Zinser C, Seidlitz HK, Welzl G, et al (2007) Transcriptional profiling of summer wheat, grown under different realistic UV-B irradiation regimes. *Journal of Plant Physiology*, v.164 (7): 913-922.